

A krónikus aktív és passzív mozgástréning hatásai az idősödő agyra állatkísérletes modellben

Doktori értekezés

Téglás Tímea

Testnevelési Egyetem
Sporttudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Nyakas Csaba, professor emeritus, DSc

Hivatalos bírálók: Dr. Balaskó Márta, egyetemi docens, PhD

Dr. Miklya Ildikó, egyetemi docens, PhD

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Tóth Miklós egyetemi tanár, DSc

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Pavlik Gábor professor emeritus, DSc

Dr. Máthé Endre egyetemi docens, PhD

Budapest

2019

Tartalomjegyzék

Ábrajegyzék.....	3
Rövidítések jegyzéke.....	5
1. Bevezetés.....	6
2. Irodalmi áttekintés.....	8
2.1 Az öregedő agy	8
2.2 Az aktív testedzés hatásai az agyra.....	11
2.3 A passzív testedzés hatásai az agyra.....	13
2.4 A BDNF szerepe a testedzésben.....	15
2.5 A kolinerg neurotranszmisszió	16
3. Célkitűzések	17
4. Anyagok és módszerek.....	19
4.1 Az aktív mozgástréning	19
4.2 A passzív mozgástréning	20
4.3 Magatartás tesztek.....	21
4.3.1 A nyílt porond teszt	22
4.3.2 Az új tárgy felismerés teszt	22
4.3.3 A Morris vízi útvesztő teszt.....	24
4.4 Immunhisztokémiai vizsgálatok	25
4.5 Molekuláris biológiai vizsgálatok.....	26
4.6 Statisztikai elemzés.....	28
5. Eredmények.....	29
5.1 A kísérleti állatok túlélése.....	29
5.2 A magatartás tesztek eredményei.....	30
5.2.1 A nyílt porond teszt eredményei - aktív testedzés	30

5.2.2	A nyílt porond teszt eredményei - passzív testedzés	32
5.2.3	Az új tárgy felismerés teszt eredményei - aktív testedzés	33
5.2.4	Az új tárgy felismerés teszt eredményei - passzív testedzés	35
5.2.5	A vízi útvesztő teszt eredményei - aktív testedzés	36
5.2.6	A vízi útvesztő teszt eredményei - passzív testedzés	39
5.3	Az immunohisztokémiai vizsgálatok eredményei - aktív testedzés	40
5.4	A molekuláris biológia vizsgálatok eredményei - passzív testedzés	44
6.	Megbeszélés	46
7.	Következtetések	54
8.	Összefoglalás.....	56
9.	Summary	58
10.	Irodalomjegyzék.....	60
11.	Saját publikációk jegyzéke.....	80
11.1	Disszertációhoz kapcsolódó közlemények	80
11.2	Független közlemények	80
12.	Köszönetnyilvánítás	81

Ábrajegyzék

1. ábra. Az agy tömegének változása az életkor előrehaladtával.	9
2. ábra. Az egészséges agy és az Alzheimer-kóros agy összehasonlító szemléltetése... ..	10
3. ábra. Az aktív testedzés kísérleti protokolljának sematikus ábrázolása.	19
4. ábra. Az aktív testedzés és a kísérleti viszonyok szemléltetése.	20
5. ábra. Az EMF passzív testedzés és kísérleti körülményeinek szemléltetése.....	21
6. ábra. A nyílt porond tesztben használt aréna sematikus ábrázolása.	22
7. ábra. Az nyílt porond teszt doboz (aréna), valamint az új tárgy felismerése teszt szemléltetése.....	23
8. ábra. A vízi útvesztő teszt sematikus ábrázolása.	24
9. ábra. A patkány hippocampusz (egyik fél) dorzális metszetének képe.....	25
10. ábra. A mortalitás ábrázolása az aktív testedzés kísérletében.	29
11. ábra. A nyílt porond teszt eredményei.....	31
12. ábra. A nyílt porond teszt eredményei 32 hónapos állatokban.....	32
13. ábra. Az új tárgy felismerés teszt eredményei három különböző korcsoportban.	34
14. ábra. Az új tárgy felismerés teszt eredményei.....	36
15. ábra. A Morris vízi útvesztő teszt eredményei.....	38
16. ábra. A Morris vízi útvesztő teszt eredményei.....	39
17. ábra. A hippocampusz immunohisztokémiai elemzése.....	42

18. ábra. A kolinerg rostsűrűség változása a motoros és a szomatoszenzoros kéregben.	44
19. ábra. Az EMF kezelés hatásai a BDNF relatív denzitására hippocampusban.....	45

Rövidítések jegyzéke

μ T	mikroTesla
3xTg-AD	3xTg-Alzheimer-kóros állattörzs, angolul 3xTg-Alzheimer-disease (AD)
acetyl-KoA	acetyl-koenzimA
BDNF	agyieredetű növekedési faktor, Brain Derived Neurotrophic Factor
CA1	hippokampális régió (Cornu ammonis 1. réteg)
ChAT	kolin acetiltranszferáz, Choline AcetylTransferase
DG	girusz dentátusz, Dentate Gyrus
ELF-EMF	alacsony frekvenciájú elektromágneses tér, Extreme Low Frequency ElectroMagnetic Field
EMF	elektromágneses tér, ElectroMagnetic Field
HCl	hidrogén klorid
Hz	hertz
M1	motoros kéreg
mM, M	millimól, mól
NaCl	nátrium klorid
PVC	poli (vinil-klorid)
PVDF	polivinilidín fluorid membrán
SDS-PAGE	szódium dodecyl szulfát-polyakrilamid gél elektroforézis
TBST	angol rövidítés, Tris Buffered Saline Tween 20
TEMED	Tetrametil-etilén-diamine
WHO	Egészségügyi Világszervezet, World Health Organization

1. Bevezetés

Ismert, hogy az idős populációba tartozó emberek száma az átlagéletkor kitolódásával drámaian nő, a WHO 2015-ben a 60 év felettiek számát felmérő adatok alapján (46 millió idős) arra a következtetésre jutott, hogy 2050-re számuk elérheti a 157 milliót (World Health 2015).

Mint tudjuk, az életkor előrehaladtával számos fiziológiai elváltozás következik be a szervezetben, valamint magasabb a kockázat a különböző betegségek kialakulására nézve. A 60 éves korosztályra általánosan jellemzőek a hallást, látást, a mozgást érintő funkciócsökkenés, valamint a szív-és krónikus légzőszervi rendellenességek, továbbá a stroke, a rák és a demencia. Ez utóbbival a 2015-ös adatok alapján világszerte több, mint 47 millió ember volt érintett, amely emberek száma 2030-ra elérheti a 75 millió főt. Jelenleg ezen adatok jelentik korunk legnagyobb egészségügyi kihívását, hiszen a demencia személyes, társadalmi és gazdasági következményei nem hanyagolhatók el. A 2030-as évre vonatkozó becslések szerint a demenciában szenvedő betegek ellátásának költsége 1,2 trillió dollár lesz, amely egyértelműen akadályt jelenthet a társadalmi és gazdasági fejlődésre szerte a világban.

A közhiedelemmel ellentétben azonban a demencia nem elkerülhetetlen következménye az öregedésnek, megfelelő mentális és fizikai aktivitással megelőzhető a betegség során kialakuló kognitív hanyatlás (Muscari és mtsai 2010).

Munkám első periódusában különböző -leginkább idős- életkorokban vizsgáltam az aktív testedzés krónikus hatásait az állatok kognitív képességeit tanulmányozva. Ezen időszak további részét képezi az időskori kolinerg neurotranszmisszió vizsgálata is, mivel a kolinerg pályákban az életkor előrehaladtával csökken az acetilkolin szintje. Ezért egyik célom az volt, hogy az idős patkányok hippokampális kolinerg pályáiban a feltehetően csökkenő kolinerg aktivitást aktív mozgástréninggel pozitívan befolyásoljam.

A vizsgálataim második periódusát a passzív testedzésre irányuló kutatómunka alkotta, amely során a krónikus passzív testedzés hatására bekövetkező változásokat tanulmányoztam idős patkányok kognitív képességeit felmérve. Mivel a testedzés ezen

típusa még nemzetközileg is kevésbé ismert, felmerült bennem a kérdés, hogy milyen mennyiségi változások következnek be az idősödő patkányok agyában kifejeződő faktorokban, legfőképpen a BDNF-ben (brain derived neurotrophic factor-agyi eredetű növekedési factor). Így a kutatási periódust kiegészítettem e fehérje biokémiai analízisével.

Munkám legfőbb célja az volt, hogy tanulmányozzak egy olyan hathatós terápiát -és annak paramétereit-, amely kiegészíthet vagy helyettesíthet egyes gyógyszeres terápiákat a demencia témakörében, valamint fontos szerepet játszana a fenti betegségek kialakulásának megelőzésében. Ezen kutatás kiemelkedő fontosságát alátámasztja, hogy a kapott eredmények a jelenlegi nemzetközi szakirodalmat igen ritka adatokkal bővítenék.

2. Irodalmi áttekintés

2.1 Az öregedő agy

Az öregedő agy egyes struktúráiban a szinapszisok száma csökken, vagy a szinapszisok alakváltozást szenvednek (Luiten és mtsai 2013). A frontális és temporális régiókban még ép intellektus mellett is fokozódik a kéreg alatti központokból kiinduló mielinhüvely nélküli neuronrendszerek sérülékenysége (Grady és Craik 2000, Baquer és mtsai 2009). A kor előrehaladtával csökken az agy tömege (1. ábra), az idegsejtek atrófiája és részleges pusztulása figyelhető meg az agy különböző területeiben, különösen ha neurodegeneratív folyamatok is fennállnak (Nairn és mtsai 1989, Tang és mtsai 1997). A neuronális aktivitás korral együtt járó változásait számos tanulmány alátámasztja (De Santi és mtsai 1995, Rypma és D'Esposito 2000, Cabeza és mtsai 2002, Stern és mtsai 2005, Rossini és mtsai 2007, Gazzaley és mtsai 2008; van Dinteren és mtsai 2014). Az életkor előrehaladtával a neurotranszmitterek száma jelentősen csökken (Krampe 2002, Kamp és mtsai 2013), amelyek létfontosságát az egyes neurodegeneratív betegségek (pl.: Alzheimer és Parkinson-kór) kialakulási kockázatának növekedése mutatja (Bonaconsa és mtsai 2013).

Az Alzheimer-kór esetében a kolinerg neuronok száma csökken a bazális előagyban (Dringenberg 2000a, Kotagal és mtsai 2012b), valamint jellemzőek a memória és a kognitív diszfunkciók (Selkoe 2001, Gandy 2002). A Parkinson-kór esetében a kolinerg neuronok szelektív pusztulása figyelhető meg (Bohnen és mtsai 2009, Bohnen és Albin 2011, Kotagal és mtsai 2012a). Az öregedés által indukált hanyatlás okai legfőképpen a csökkent koordinációs képességek és a motoros funkciókban bekövetkező mozgások sebességének lassulása (Seidler és mtsai 2010). A korfüggő kognitív és viselkedési deficitiek esetében felmerült a korral járó acetilkolin, a szerotonin és a noradrenalin szintjének csökkenése (Seidler és mtsai 2010).



1. ábra. Az agy tömegének változása az életkor előrehaladtával.

A bal oldali agyi metszet a fiatalkori agytömeget, míg a jobb oldali metszet az időskori agytömeget reprezentálja (©Alzheimer's Association.org).

Vizsgálataim központjában a hippocampus tanulmányozása állt. Ezen agyterület a limbikus rendszer részét képezi, és fontos szerepet játszik a hosszútávú, a rövidtávú és térbeli memóriából származó információk megerősítésében (Fanselow és Dong 2010). A dorzális, a ventrális és középső részei különböző funkciókat látnak el: a dorzális hippocampus felel a térbeli és verbális memóriáért, valamint a konceptális információk tanulásáért. A legkiemelkedőbb életkorfüggő struktúrális változások a hippocampusszal kapcsolatosak: több tanulmány alátámasztja a térbeli tanulás és a memória csökkenését (Moffat és mtsai 2001, Driscoll és mtsai 2003; Antonova és mtsai 2009, Konishi és mtsai 2013), a hippocampus nagyságának csökkenését (Raz és mtsai 2010), valamint a fehérállományban található neokortikális neuronok számának 10%-os redukálódását (Pakkenberg és Gundersen 1997). Több képalkotással foglalkozó tanulmány demonstrálja az idősök hippocampusának csökkent aktiválódását egyes térbeli memória tesztek alatt (Moffat és mtsai 2006). Az idősödő humán agyban bekövetkező fehérállomány változások feltételezhetően előidézik a teljes idegrost állomány és az idegrostok hosszának csökkenését (Tang és mtsai 1997). Mivel minden

neuron keletkezése posztmitotikus a humán celebrális kortextben, továbbá ezen sejtek nem képesek a regenerálódásra, számuk csökkenésének eredménye visszafordíthatatlan viselkedésbeli változásokat eredményez (Rakic 1985). Több tanulmány megállapította, hogy a hippocampusban található neuronok számának csökkenése összefügg az öregedéssel és a demenciával járó memóriavesztéssel (Morris 1984a, Mani és mtsai 1986, Burke 1992). Leírták továbbá, hogy különbség van az öregedés és az Alzheimer-kór következtében kialakuló neuronvesztés között (Selkoe 1982). A fehér- és szürkeállomány tömegének Alzheimer-kórral összefüggő változását az 2. ábra mutatja be. A subiculum és fascia dentata agyi területekben bekövetkező neuronvesztés bizonyítottan az Alzheimer-kór következménye, nem pedig a normál öregedés velejárója (Šimić és mtsai 1997). Számos nemzetközi szakirodalmi adat alátámasztja, hogy az Alzheimer-kóros agyban a neuronális szinaptikus kapcsolatok redukálódnak (Larson és mtsai 1999, Xu és mtsai 2005), továbbá a kognitív hanyatlás kifejlődése rácsálókban többnyire a fiziológiai öregedés következménye (Foster 2006).



2. ábra. Az egészséges agy és az Alzheimer-kóros agy összehasonlító szemléltetése.

A bal oldali dorzális agyi metszet a normál, egészséges agyi állományt, míg a jobb oldali metszet az Alzheimer-kórral összefüggő fehér-és szürkeállományban bekövetkező változásokat szemlélteti (©Alzheimer's Association.org).

Az egészséges öregedés és életstílus azonban képes meggátolni a kognitív teljesítmény hanyatlását, valamint az izomtrófiát: idős patkányokban, idős emberekben és Alzheimer-kórban szenvedő betegekben egyaránt (Rolland és mtsai 2007, Hillman és mtsai 2008).

A demencia az érzelmek, a gondolkodás, valamint a társas képességek hanyatlása. 2016-ban az első számú halálozási okként tartották számon Angliában és Walesben, ezzel megelőzte a szív- és érrendszeri megbetegedésekkel kapcsolatos elhalálozásokat. A demencia elsősorban a rövid- és hosszútávú memóriát, valamint a mozgást érinti. Leggyakoribb formája az Alzheimer-kór és a vaszkuláris demencia. A jelenlegi gyógyszeres terápiák a demenciát megelőzni és megállítani nem képesek, csak késleltetni tudják a már kialakult folyamat előrehaladását.

2.2 Az aktív testedzés hatásai az agyra

Az utóbbi évtizedekben számos tanulmány alátámasztotta, hogy a fizikai aktivitás támogatóan hatott a neurodegeneratív betegségek prevenciójára, csökkentette azok progresszióját (Sutoo és Akiyama 2003, Pérez és Cancela Carral 2008, Leem és mtsai 2011, Zigmond és mtsai 2012, Paillard és mtsai 2015). Alzheimer-kórban szenvedő betegek esetében az aktív mozgástréning csökkentette a depresszív tüneteket, valamint javulás mutatkozott a kognitív és fizikális teljesítőképességben egyaránt (Teri és mtsai 2013). A rendszeres fizikai aktivitás hozzájárul az angiogenezis, a neurogenézis, a szinaptogenezis és a neurotranszmitter szintézis fokozásához különböző agyi területekben, amelyek a memóriáért és a mobilitásért felelősek (van Praag és mtsai 1999, Pereira és mtsai 2007, Dietrich és mtsai 2008, Lange-Asschenfeldt és Kojda 2008, Archer 2011). Állatkísérletekben több tanulmányban alátámasztották, hogy a fizikai aktivitás pozitív hatást gyakorolt a hippocampusz-függő memória- és tanulási teljesítőképességre (Fordyce és Farrar 1991, van Praag 2005), javította a térbeli tanulás képességét és a rövid távú memóriát (Radak és mtsai 2006, O'Callaghan és mtsai 2007) felnőtt állatokban. A testedzés egészséges alanyokban bizonyítottan javította a kognitív és motoros funkciókat (Voelcker-Rehage és Niemann 2013), pozitív hatásai összefüggésbe hozhatók a demencia kialakulásának alacsonyabb valószínűségével

(Aarsland és mtsai 2010, Defina és mtsai 2014, Meco és mtsai 2014), az Alzheimer-kór (Pitkäla és mtsai 2013, Barnard és mtsai 2014) és a Parkinson-kór prevenciójával (Ahlskog 2011, Alonso-Frech és mtsai 2011). A fizikai aktivitás összefügg az Alzheimer-kór kialakulásával olyan szempontból, hogy a betegség kialakulásának kockázata alacsonyabb, a progressziója pedig késleltetett a fizikai aktivitás hatására (Geda és mtsai 2010, Abe 2012, Karceski 2012, Luck és mtsai 2014, Norton és mtsai 2014). Szintén Alzheimer-kóros betegek esetében a testedzés hatására javult a kogníció (Ferencz és mtsai 2014, Tanigawa és mtsai 2014). Lin és munkatársai (2015) alátámasztották, hogy az amigdalában és a hippocampusban található neuronokra kifejezetten védő hatást fejtett ki a testedzés az Alzheimer-kóros degeneráció esetében, de e mechanizmusok még nem teljesen ismertek. Több tanulmány is megerősíti azonban, hogy a fizikai aktivitás támogatja a humán agyi regenerációt, beleértve a hippocampusz-amigdala által támogatott tanulást és memóriát (Liu és mtsai 2009, van Praag 2009a, Erickson és mtsai 2011b, Lin és mtsai 2012). A testedzés pozitív hatásait különböző hippocampusz-függő tesztek is alátámasztják, például a térbeli referencia memória változása (Van der Borch és mtsai 2007). Fabel és munkatársai (2009) leírták, hogy a fizikai és mentális aktivitás kombinálása additív hatással bírt a hippocampusz sejtjeit tekintve, illetve az időskori agytömeg csökkenése a rendszeres testmozgás hatására lassabban következik be (Colcombe és mtsai 2006, Erickson és mtsai 2011b, Benedict és mtsai 2013). Néhány tanulmányban megfigyelték, hogy a heti három alkalommal végzett gyorsgyaloglás (40 perc/alkalom) csökkentette az agyi atrofíát, a futópados edzések pedig jobb memóriát és egyéb kognitív funkciókat eredményeztek (Stranahan és mtsai 2010, Hötting és Röder 2013, Choi és mtsai 2014).

A demencia, azon belül az Alzheimer-kór megelőzésére és kezelésére jelenleg nincs hathatós, gyógyszeres terápia. Az aktív testmozgás tehát kiemelkedő preventív faktor az Alzheimer-kór megelőzésében (Paillard és mtsai 2015), ezért szükséges feltárnunk és megismernünk a fizikai aktivitás hatásait időskorban. Ezen információk segítséget nyújthatnak ahhoz, hogy új és/vagy tökéletesített opciókat határozzunk meg a testmozgásra vonatkozóan, amely paramétereknek kiemelkedő szerepük lenne a demencia kezelésében és megelőzésében.

2.3 A passzív testedzés hatásai az agyra

A testedzés aktív formái aránylag ismertek, de figyelmet kell fordítani az ún. „passzív” formákra is, mint amilyen a passzív fizioterápia, a test mechanikus vibrációja, vagy a jelentős fejlődést mutató kémiai testedzés. Az általam használt pulzáló elektromágneses stimuláció (electromagnetic field-elektromágneses tér, EMF) ez utóbbi kategóriába tartozik. A passzív terápia különösen fontos lehet a mozgáskorlátozottaknak, a kerekesszékekbe kényszerülteknek, vagy a súlyos betegségből adódóan kórházban fekvő betegek számára is. Az EMF terápia tehát ezt a betegcsoportot is figyelembe veszi számos más mozgáskorlátozottsággal járó fizikai állapot mellett. Az EMF stimuláció, mint mozgásterápiás forma általánosan elismert, és számos betegség terápiájában kapott már alkalmazást, az eddigi molekuláris és celluláris szintű alapkutatások pedig szintén pozitív eredményeket mutatnak, bár e tanulmányok száma eltörpül az aktív testedzéssel kapcsolatos kutatások mellett.

A mágneses mező erőssége a Föld felszínén 30-60 mikroTesla (μT) körüli, Budapesten kb. 50 μT -ra tehető ennek mértéke. A testnek léteznek olyan közegei, mint az idegrendszer, a vérerek és az izmok egyes szakaszai, amelyek alkalmasak a mágneses örvényáramok vezetésére (Barker és mtsai 1987, Tseyslyer és mtsai 2012, Troost és mtsai 2017). A mágneses energia a szervezetben található membránrendszerekre hat a leginkább (sejtmembrán, a kromoszóma határrejtegei, a mitokondrium részecskék valamint a hajszálérfalak, az ideg- és izomrostok). A váltakozó mágneses mezők a sejtmembránban idéznek elő változásokat, így valószínűleg a sejt felszínén található receptorok konformáció változást szenvednek, valamint számuk megváltozik, ezáltal befolyásolva egyes biokémiai folyamatokat.

Az EMF két fajtája közül az ELF-EMF (extreme low frequency-extrém alacsony frekvencia, a továbbiakban csak EMF) mozgásterápia tanulmányozását választottam, kiküszöbölve ezzel a magasabb frekvenciájú elektromágneses tér által létrehozott negatív effektusokat. Az ELF-EMF frekvenciája 300 Hz alatti, tehát az egy másodperc alatti elektromágneses impulzusok száma 300 alatti értéket mutatott.

Az EMF bizonyítottan fokozta a szinaptikus aktivitást különböző kortikális területekben (Varró és mtsai 2009), valamint növelte a kolin kötődését a patkány

hippokampuszban, ezáltal növelve az acetilkolin szintet (Lai és mtsai 2016). A kolin felvételének további változását figyelték meg az elülső kéregben és a hippokampuszban, miután 0,75 mT EMF kezelést kaptak a kísérletben részt vett állatok (Lai és mtsai 1993). Több tanulmány is arról számol be, hogy az idegi regenerálódás nőtt patkányokban (Byers és mtsai 1998) és *in vivo* kísérletekben (Basser és Roth 1991, McCaig és Rajnicek 1991, Zienowicz és mtsai 1991). A 90 napos (2 óra/nap), 100 μ T-ás és 50 Hz-es kezelés pozitívan befolyásolta a szinaptikus plaszticitást szintén patkányokban (Komaki és mtsai 2014). Néhány tanulmány arról számolt be, hogy az EMF kezelés hatására növekedett a patkányok aktivitása a nyílt porond tesztben (Persinger és mtsai 1973, Ossenkopp és Ossenkopp 1983, Rudolph és mtsai 1985, Dura és mtsai 1988). Korábbi vizsgálatok leírták a passzív mozgástréning káros hatásait különböző memóriafunkciókban (szociális memória, térbeli memória, tárgy felismerő memória, stb.) szintén patkányokban (Jadidi és mtsai 2007, Li és mtsai 2007). Ugyanakkor alátámasztottak pozitív hatásokat is a memória tesztekre nézve (Liu és mtsai 2008), tehát a nemzetközi eredmények nagyban függnak az EMF kezelés speciális paramétereitől. Zhang és munkatársai (2015) arról számoltak be, hogy patkányoknál nem találtak semmilyen hatást a kognitív teljesítőképességre és memóriára nézve 100 μ T / 50 Hz EMF kezelés esetében. Több tanulmány azonban megerősíti, hogy van kapcsolat az EMF kezelés és a tanulási- és memóiafolyamatok között (Mostafa és mtsai 2002, Vázquez-García és mtsai 2004). Liu és munkatársai (2015) humán vizsgálatai alátámasztották, hogy az EMF kezelés késleltette az Alzheimer-kórban szenvedő betegek kognitív és klinikopatológiai tüneteit.

A passzív testedzésre irányuló vizsgálataim célja az volt, hogy megértsem az EMF stimuláció molekuláris, sejt- és szerveszintű hatásmechanizmusait a hippokampuszban, valamint válaszokat kapjak a kezelésekre fizikai és mentális állapotra vonatkozó hatásait illetően idős szervezetben.

2.4 A BDNF szerepe a testedzésben

A fizikai aktivitás a neurotrofikus és neuroprotektív hatását valószínűleg egyes növekedési faktorok aktivációján keresztül fejt ki. A mozgás-hatás legpotensebb közvetítői között a BDNF-t érdemes kiemelni, amely neurotrofin nélkülözhetetlen agyi funkciókat lát el, többek között részt vesz a tanulás és az emlékezet folyamatában. Az agyra vonatkozó, igen széles hatását több nemzetközi közlemény támasztja alá. Kiemelkedő fontosságú neurotrofikus faktor, amelynek fontos szerepe van az agyi szinaptikus kapcsolatokban, és a szinaptikus plaszticitásban (Ando és mtsai 2002). Szignalizációs útvonalait a testedzés bizonyítottan aktiválja (Wu és mtsai 2011). A legújabb in vivo vizsgálatok kimutatták, hogy számos biológiai aktivitást modulálhat az EMF expozíció (Golbach és mtsai 2015). Egyes tanulmányok leírták, hogy a BDNF szintje csökken Alzheimer-kóros betegekben és normál idősödés hatására (Ploughman és mtsai 2007, Nichol és mtsai 2008). Alzheimer-kóros modellállatokban már demonstrálták, hogy a BDNF szintjének növekedése előidézhető aktív testedzéssel: az 5 hónapig tartó futópados edzés Alzheimer-kóros egerek esetében javította a térbeli memóriát és szignifikánsan növelte a BDNF pozitív sejtek számát és a neurogenezist a cerebrális kéregben, valamint a hippokampuszban (van Praag 2005, Stranahan és mtsai 2012, Xiong és mtsai 2015). Ismert tehát, hogy a BDNF megnövekedett expressziója lényeges szerepet játszik a testmozgás jótékony hatásában (Adlard és mtsai 2005, Wu és mtsai 2011, Stranahan és mtsai 2012, Coelho és mtsai 2014). 3xTg-AD egértörzsben a hippokampusz és cerebrális kéreg redukálódott BDNF szintjét a 12 hétig tartó edzés szinten tudta tartani (Cho és mtsai 2015). In vivo kísérletekben bizonyítást nyert a passzív típusú testedzés (EMF) hatása a BDNF expressziójának növekedésére (Li és mtsai 2014).

Az állatkísérleteket tekintve a passzív testedzés során bekövetkező BDNF szint változásra vonatkozó nemzetközi szakirodalmi adatok jelenleg hiányoznak -szemben az aktív testedzéssel kapcsolatos számos kísérlettel-, így megfogalmazódott bennem a kérdés: bekövetkezik-e változás a BDNF szintjében a krónikus passzív testedzés hatására idős patkányok esetében?

2.5 A kolinerg neurotranszmisszió

A kolinerg neurotranszmisszió a központi idegrendszer mellett a harántcsíkolt izomzatban, valamint az autonóm és paraszimpatikus idegrendszerben is fontos szerepet játszik. A transzmisszió kulcsmolekulája az acetilkolin, amely a kolinerg szinapszisokban keletkezik kolinból és acetyl-KoA-ból (Vizi 1997). A folyamatot a kolin-acetyl-transzferáz (choline acetyltransferase, ChAT) enzim katalizálja. A kolinerg neuronok öregedése során megváltozik az acetilkolin receptorok expressziója, így mivel a kolinerg pályák nagy szerepet játszanak a kognitív funkciókban, degenerációjuk memória- és tanulási képességek csökkenéséhez vezet (Lippa és mtsai 1980). Neurodegeneratív betegségek esetében csökken a kolin szinapszisokból történő kiáramlása, valamint visszavétele (Picciotto és Zoli 2002).

Mivel az életkor előrehaladtával csökken az acetilkolin szint, ezért egyik célom az volt, hogy különböző életkorú patkányok hippocampális kolinerg pályáiban a feltehetően csökkenő kolinerg aktivitást aktív mozgásterápiával befolyásoljam. Mivel a kolinerg neurotranszmisszióknak az acetilkolin által a memóriában és a tanulási folyamatokban is fontos szerepe van, így a másik cél egyértelmű volt: csökkenteni vagy megakadályozni az időskori kognitív hanyatlás mértékét.

3. Célkitűzések

Kísérleteimben két fő protokoll alapján vizsgáltam a testedzés agyi öregedésére kifejtett hatásait, ennek megfelelően a következőképpen foglalnám össze célkitűzéseimet:

A. Kísérlet. A krónikus aktív testedzés hatásai az agy öregedésére különböző életkorú hím patkányokban

Az irodalmi áttekintésben részletezett adatok alapján a testedzés bizonyítottan kedvezően hat az agyi öregedésre, de az idős állatmodellen végzett kísérletek száma egyelőre kevés. Ennek oka valószínűleg az a limitáló tényező, hogy az idős patkányok fenntartási költsége jóval magasabb, hiszen főként 24-32 hónapos állatokról beszélünk, továbbá a viselkedési tesztek sokszor nehezen kivitelezhetők az életkorból adódó aktivitáscsökkenés, túlsúly és egyéb faktorok miatt. A rövid távú tesztek eredmények száma lényegesen nagyobb, mint a krónikus testedzést vizsgáló tanulmányok összessége. A krónikus testedzés jóval időigényesebb folyamat, a doktori értekezésemben részletezett kísérletek során, a futópadon történő edzések heti három, alkalmanként 40 percig tartottak 6 hónapig. A 6 hónapos intervallumot követően került sor a viselkedési tesztek elvégzésére, majd az állatok feldolgozására és csak ezután következtek a különböző laboratóriumi analízisek. A nemzetközi szakirodalmi adatok és a fentiek alapján hipotéziseimet a következőkben foglalom össze:

- A1.** A krónikus aktív testmozgás képes javítani a patkányok rövid- és hosszú távú memóriáját.
- A2.** A krónikus aktív testmozgás képes javítani a patkányok térbeli tanulási képességét.
- A3.** A rendszeres testedzés pozitívan hat a patkányok horizontális és vertikális aktivitására.
- A4.** A hosszú távú testmozgás képes pozitívan befolyásolni a csökkenő kolin-acetiltranszferáz szintet, ezáltal hat a kolinerg neurotranszmisszióra időskorban, az agy egyes mozgásért és memóriáért felelős területeiben.

B. Kísérlet. A krónikus passzív testedzés hatásai az agy öregedésére idős hím patkányokban

A szakirodalmi adatok alapján elmondható, hogy a passzív testedzésre irányuló kísérletek száma nemzetközi viszonylatban rendkívül kevés. Gyakorlatilag még nem jelent meg olyan tanulmány, amely aggkorú patkányokban vizsgálta volna a passzív testedzés kognitív hatásait. Ennek oka valószínűleg abban keresendő, hogy a passzív testedzés még kevésbé terjedt el az aktív testmozgáshoz viszonyítva. Az átlagéletkor kitolódásával, valamint az idős populáció nagyságának növekedésével azonban kiemelkedő a fontossága, hiszen a kórházban fekvő vagy a járásképtelen -tehát fizikai aktivitásra alkalmatlan- embereknél kiválóan alkalmazható lenne az izomatrófia és a neurodegeneratív betegségek megelőzése céljából. Nemzetközi tanulmányok beszámoltak arról, hogy a passzív testedzés -ezen belül az EMF- pozitívan befolyásolta a szinaptikus plaszticitást patkányokban (Komaki és mtsai 2014). Szignifikánsan csökkentette a csonttraktus kialakulásának valószínűségét, fokozva a csontok mineralizációját 6 hetes 1 mT-ás és 50 Hz-es kezelés esetében, szintén patkányokban (Sert és mtsai 2002). Gátolta az oszteonekrózist, a tumoros elváltozásokat és a diabetes kialakulását (Bassett 1993). Humán mezenhimális őssejtekben fokozta az alkalikus foszfatáz és az oszteokalcin termelődését (Luo és mtsai 2012). A passzív testedzés eredményeire vonatkozó hipotéziseimet ezek alapján a következőképpen foglalnám össze:

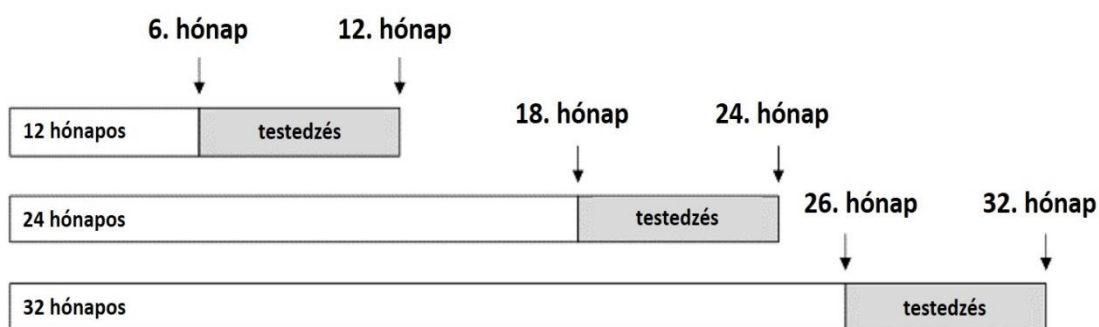
- B1.** A krónikus EMF terápia javítja az idős patkányok rövid- és hosszútávú memóriáját.
- B2.** A rendszeres EMF kezelés befolyásolja az idős patkányok térbeli tanulási képességét, javítva azt.
- B3.** A krónikus EMF terápia pozitív hatást gyakorol az aktivitásra idős patkányokban (horizontális és vertikális aktivitás).
- B4.** A fentebb részletezett tanulmányokból kiindulva feltételezésem szerint az EMF egyes neurotrofikus faktorokra is pozitív hatást gyakorol, így növeli az általam vizsgált BDNF mennyiségét a hippokampuszban.

4. Anyagok és módszerek

4.1 Az aktív mozgástréning

Kísérleteimben életkoronként 12-32 hónapos Wistar patkányokat használtam ($n = 60$), amely állatok kora kiválóan tükrözi az idős emberi életkort. A 30 hónapos állatok emberi életkorra viszonyítva körülbelül 90 évesek. Az állatokat szobahőmérsékleten (22 ± 1 °C) tartottuk 12-12 órás világos/sötét megvilágítási periódus alatt. A táplálékhoz és vízhez *ad libitum* hozzáférésük volt. A 12-32 hónapos állatokat random módon hat kísérleti csoportra osztottam a következő módon (3 ábra):

- 1) Három inaktív kontroll csoport (12, 24 és 32 hónapos patkányok; $n = 10$ mindhárom életkorú csoportban): a csoportok állatai nem vettek részt a mozgástréningben.
- 2) Három edzett csoport (12, 24 és 32 hónapos patkányok; $n = 10$ mindhárom életkorú csoportban): a csoportok állatai heti háromszor 40 percet, 12 méter/perc sebességgel gyalogoltak futópadon 6 hónapig (4. ábra). A futópad (#Taktronik PF-06, Magyarország) sebessége egy enyhe, mérsékelt fokozatú testmozgásnak felelt meg. A kontroll csoport állatait a kikapcsolt állapotban lévő futópadra helyeztem 40 percre.



3. ábra. Az aktív tesztelés kísérleti protokolljának sematikus ábrázolása.

Az aktív tesztelésben részt vett állatcsoportok kezelési idejének (utolsó 6 hónapban részesültek aktív tesztelésben, szürkével jelölt rész) és életkorának (12,24,32 hónapos kor) szemléltetése.



4. ábra. Az aktív testedzés és a kísérleti viszonyok szemléltetése.

A kísérletek során használt futópad patkányok részére lett kifejlesztve, amely kényszerített, úgynevezett erőltetett edzésnek felel meg.

4.2 A passzív mozgástréning

Kísérleteimben 30-32 hónapos Wistar patkányokat használtam ($n = 43$), amely állatok kora az emberi agykornak felel meg. Az állatokat szobahőmérsékleten (22 ± 1 °C) tartottuk 12-12 órás világos/sötét megvilágítási periódus alatt. A táplálékhoz és vízhez *ad libitum* hozzáférésük volt. A 30-32 hónapos állatokat random módon négy kísérleti csoportra osztottam a következő módon:

- 1) Kontroll csoport ($n = 11$): a csoport állatai nem kaptak kezelést.
- 2) Három különböző dózisé EMF (MCR-Sport, #Santerra Forschungs- und Vertriebs GmbH, Piding, Németország) kezelést kapott állatcsoport ($45 \mu\text{T}$ $n = 8$, $95 \mu\text{T}$ $n = 11$, $1250 \mu\text{T}$ $n = 10$): a csoportba tartozó állatok hat héten keresztül, hetente 3 x 24 perc kezelést kaptak a fent leírt intenzitásokkal. A kísérlet kezdetekor négy alkalommal, 12 perces előkezelést iktattam be a kezelési programba.

A kezelés során az állatokat egy PVC lakódobozba, majd az elektromágneses készülék adapterére (párna) helyeztem (5. ábra). A dobozra egy másik fordított helyzetű dobozt

helyeztem el, amely biztosította a kezelt állatok megfelelő nyugalását. A kontroll csoportba tartozó állatokat az 5. ábrán látható módon szintén a dobozokba helyeztem, azonban az EMF készülék ebben az esetben kikapcsolt állapotban volt.



5. ábra. Az EMF passzív testedzés és kísérleti körülményeinek szemléltetése.

Az állatok a kezelés ideje alatt egy PVC lakódobozban voltak elhelyezve.

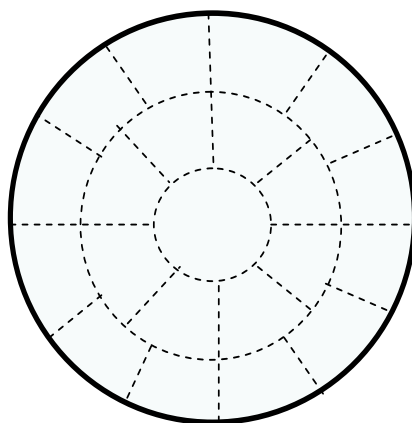
4.3 Magatartás tesztek

Vizsgálataim során tanulmányoztam a térbeli mozgás és gyaloglás képességét új környezetben (nyílt porond teszt, angol rövidítéssel OF-Open Field), a figyelmet és a rövid távú memóriát (új tárgy felismerése teszt, angol rövidítéssel NOR-Novel Object Recognition), valamint a patkányok térbeli tanulási képességét és memóriáját (Morris vízi útvesztő teszt, angol rövidítéssel MWM) az aktív és a passzív testedzés hatására. Mindkét fő kísérleti protokollban a magatartás tesztek metodikája azonos volt.

4.3.1 A nyílt porond teszt

A nyílt porond teszt vizsgálatban az állatok exploratív viselkedését, aktivitását, és az új környezethez való hozzászokását vizsgáltam (Walsh és Cummins 1976). A teszthez egy kör alapú, 80 cm átmérőjű fából készült arénát (nyílt porond) használtam, amit egy 35 cm magas fémhenger vett körül. Az aréna 20 szektorból állt, amelyek két kört (belső és külső) alkottak, amit felülről közepén egy 40 W-os izzóval világítottam meg (6. ábra). Az állatokat az aréna közepére helyeztem és 5 percig figyeltem a viselkedésüket a következő paraméterek figyelembe vételével:

- 1) pontoztam az ágaskodásokat (mindkét mellső lábat felemelve), ezek gyakoriságát és idejét a fal mentén és az aréna belső részében, valamint
- 2) a szektorok határvonalain történő áthaladások (határvonal keresztezések) számát a külső (fal melletti) és belső szektorokat elkülönítve.



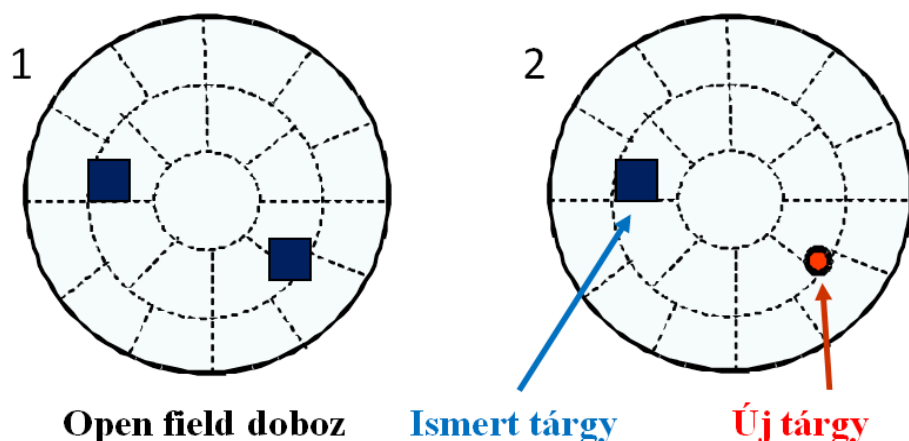
6. ábra. A nyílt porond tesztben használt aréna (doboz) sematikus ábrázolása.

4.3.2 Az új tárgy felismerés teszt

Az új tárgy felismerése teszt a figyelmi funkcióra épülő tárgyfelismerést vizsgálja ismert környezetben, nyílt porondon (Nyakas és mtsai 2009). A teszthez 80 cm átmérőjű, 35 cm magasságú 'open field' arénát használtam (6. ábra). Az első társítás során két azonos tárgyat helyeztem a teszt-doboz arénájába a faltól egyforma távolságra, a kör közepéhez képest aszimmetrikusan. Ezután az állatokat egyenként az aréna

közepére helyeztem. A tárgyakat a patkányok 5 percig szabadon vizsgálhatták az első társítás során, majd 120 perc elteltével került sor a második teszt fázisára, amely során két azonos tárgy közül az egyiket különbözőre cseréltem. Az új tárgy anyagában, formájában, színében és felületi simaságban is különbözött a régi tárgytól. Az arénába behelyezett tárgyakat mindkét tesztfázisban, ugyanabban a pozícióban helyeztem el (7. ábra). A második társítás szintén 5 percig tartott. Azokat az egyedeket, amelyek legalább ötször nem látogatták az egyes tárgyakat az első 5 perces időszakaszban, kizártam a vizsgálatból. A tárgy vizsgálataként értékeltem, ha az állat szagolgatta a tárgyat, amit a felsőajak tapintó szőreinek mozgása kísért, vagy hozzáértette az orrát a tárgyhoz; illetve ha a mellső lábaival érintette a tárgyat. A tárgyra ülést nem tekintettem a tárgy vizsgálatának. A második társítás alatt az új tárgy iránti preferenciát mértem másodpercekben az összes, mindkét tárgyra irányuló vizsgálati időnek %-ában. Ha az állat nem ismerte fel, hogy az egyik tárgy egy új tárgy, körülbelül azonos (50-50 %) gyakorisággal látogatta mindkettőt (megismert és új) a második teszt során.

Rekogníciós index: (%) = $\left[\frac{\text{az új tárgynál eltöltött időtartam}}{\text{(a régi tárgynál eltöltött időtartam + az új tárgynál eltöltött időtartam)}} \right] \times 100$

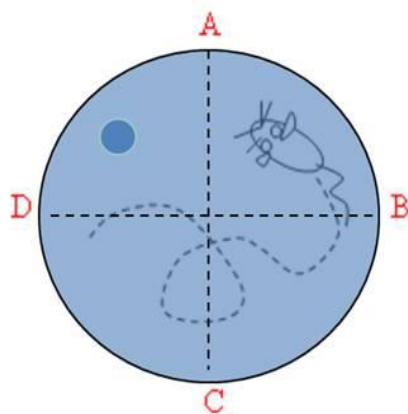


7. ábra. Az nyílt porond teszt doboz (aréna), valamint az új tárgy felismerése teszt szemléltetése.

Az 1. arénában elhelyezett két, színben, alakban, formában, tapintásában azonos tárgyak láthatók (kék négyzetek). A 2. arénában az inkubációs idő után elhelyezett régi/ismert (kék négyzet) és új (piros kör) tárgy látható.

4.3.3 A Morris vízi útvesztő teszt

A patkányok térbeli tanulási képességét Morris vízi útvesztő tesztben vizsgáltam (Morris 1984b). A vizsgálat során egy 100 cm átmérőjű, 80 cm magas műanyag medencét töltöttem fel 53 cm magasságig $26 \pm 1^\circ\text{C}$ -os vízzel. A víz felszíne alatt 1,5 cm-rel a medence egyik negyedének közepén helyezkedett el egy fixált 11 cm átmérőjű platform, aminek a pozíciója nem változott a teszt során (8. ábra). Az állatokat 5-7 napig teszteltem, minden esetben azokon a napokon, amikor nem kaptak kezelést, így zárva ki az esetleges akkut hatást. Az állatokat 4 egymástól egyenlő távolságra lévő start pontnál helyeztem a vízbe, a medence fala felé fordítva őket. A startpontok helyzete random módon változott a teszt napok során, de egy teszt napon belül állandó volt. Minden állat egy napon 4 társításban részesült a 4 különböző startpontról. Egy társítás addig tartott, amíg az állat meg nem találta a víz alatt elhelyezett platformot, amelyre maximum 90 másodperc állt rendelkezésére. Ha megtalálta a platformot vagy letelt a 90 másodperc, az állatot ráhelyeztem a platformra, ahol 30 másodpercet pihenhetett, tájékozódhatott. Ezt követte még 3 társítás. A vizsgálatban a platform megtalálásának látenciaidejét rögzítettem minden társítás esetében. A teszt során kétféle paramétert vizsgáltam: (1) a referencia memória a hosszú távú memórián alapul, ebben az esetben a teszt napok első társításait elemeztem. (2) A munkamemória kiszámításánál a négy társítást átlagoltam minden egyes napon.

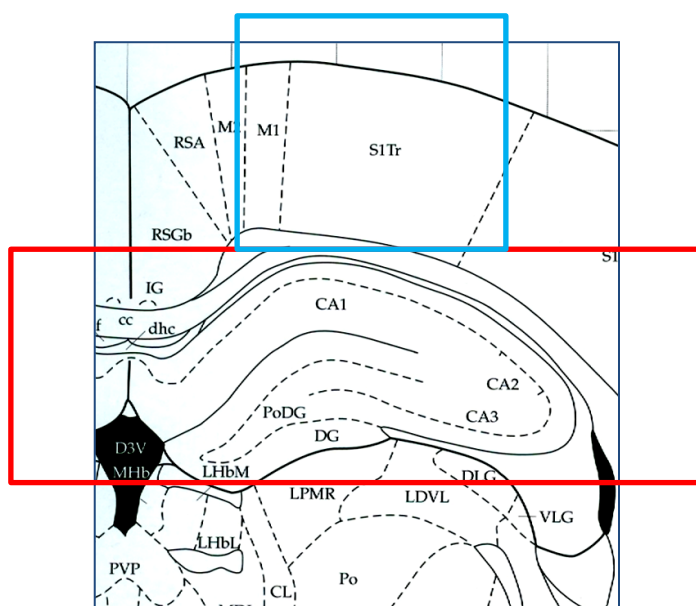


8. ábra. A vízi útvesztő teszt sematikus ábrázolása.

A start pontok (társítások) az A, B, C és D piros betűkkel vannak jelölve. A platform helyzetét (amely a teszt napok alatt állandó volt) az A és D társítás közötti sötétkék kör mutatja.

4.4 Immunhisztokémiai vizsgálatok

A feldolgozás napján az állatokat mély altatásban transzkardiálisan perfundáltuk 4% paraformaldehid oldattal 0,1 M foszfát puffer jelenlétében. Az *in situ* fixált agyakat 2 napig posztfixáltam, majd foszfát pufferben tároltam a szövettani vizsgálatig. Dehidráció után az agyakat kriosztát mikrotommal metszettem 20 mikron vastagságú szeleteket nyerve. Az agyszeleteket immuncitokémiai módszerrel festettem a ChAT pozitív rostok felismeréséhez. A primér antitestként ChAT ellenes kecske szérumot használtam (1:350 hígítás, #Millipore AB144P, Temecula, USA). A folyamat végén biotinilált másodlagos antitest kezeléssel és diamino-benzidin festéssel tettem láthatóvá a ChAT enzimet (Nyakas és mtsai 2011). A ChAT pozitív axonok denzitását különböző agyterületekben értékeltem: a hippocampusz memóriáért felelős régióiban (CA1, DG, dentate gyrus), valamint a motoros mozgásért, és a szomatoszenzoros rendszer működéséért felelős kortexekben (motoros kéreg-M1, szomatoszenzoros kéreg) (9. ábra). A kvantitatív mérés Quantimet programmal történt (Leica, Germany).



9. ábra. A patkány hippocampusz (egyik fél) dorzális metszetének képe.

A pirossal keretezett terület a hippocampusz általam vizsgált régióit jelöli: CA1 - Cornu Ammonis; DG - Dentate Gyrus. A kékkel jelölt terület az immunhisztokémiai analízis során vizsgált agykérgi területeket jelöli: M1 - motoros kéreg, Szomatoszenzoros kéreg (Paxinos és Watson 1997).

4.5 Molekuláris biológiai vizsgálatok

A kísérleti állatok hippokampuszát a feldolgozás során kipreparáltam, majd a mintákat -80°C -on tároltam. A Western blot analízisre történő szövet előkészítés során a hippokampuszt homogenizáltam egy lízis puffer oldatban (137 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 2 % Nonidet P-40, 10 % glycerol), amely különböző fehérje inhibitorokat (aprotinin, protein inhibitor keverék) is tartalmazott annak érdekében, hogy minél több fehérje maradjon ép a homogenizálás procedúrája alatt. A homogenizált szövetet folyamatos rázogató mellett 40 percig inkubáltam, majd 15 percig $15.300 \times g$ -n 4°C -on centrifugáltam. A felülúszó eltávolítását követően -80°C -on tároltam a mintákat a felhasználásig. A szövetek fehérjetartalmát Bradford mérési módszerrel határoztam meg (Bradford 1976), majd az ebből kapott adatokat felhasználtam a minták azonos koncentrációra történő hígításához, amely folyamathoz a homogenizálás során használt lízis puffert alkalmaztam. A hígítást követően 2 x Laemmli mintapufferhez (120 mM Tris-HCl pH 6.8, 4 % SDS, 20 % glycerol, 0,01 % brómfenol kék) a diszulfid-hidak feltárása érdekében 5 %-nyi béta-merkaptóetanolt adtam, majd az így nyert oldatot a homogenizált mintákhoz mértem 1:1 arányban. Az így kapott mintákat 5 percig, 95°C -on melegítettem (Laemmli 1970). A leírt módon a Western blot mérési módszerre előkészített mintákat szintén -80°C -on tároltam.

A hippokampusz minták specifikus fehérjéinek relatív mennyiségének meghatározásához 'semi-dry' Western blot analízist alkalmaztam.

A 'semi-dry' blot első lépése egy SDS-poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE, szódium dodecil szulfát-polyakrilamid gél elektroforézis) 12 %-os poliakrilamid gélen. Az SDS-gélnek két része van: az elválasztógél és a fedőgél. Az elválasztógél esetében (1,5 M Tris-HCl pH 8.8, 10 % SDS, 10 % ammonium perszulfát, 0,04 % TEMED) 10 % és 15 %-os akrilamid koncentrációkat alkalmaztam, amely koncentrációt az általam detektálni kívánt fehérje mérete határozta meg. A fedő gélben (1M Tris-HCl pH 6.8, 10 % SDS, 10 % ammónium perszulfát, 1,75 % TEMED) 5 %-os akrilamid koncentrációt használtam. A zsebekbe a minták gélre történő felvitelénél 40 μg fehérjemennyiséget vittem fel, majd a készüléket (150 V, max. I 80-110 mA, 60-100 perc #BIO-RAD Power PAC 300) futtató pufferrel töltöttem meg, (10 x törzsoldat: 30,3g/l Tris, 144g/l glicin, 10g/l SDS, pH 8.3). A vizsgált fehérjék molekulatömegük

szerinti elválasztása átlagosan 60-90 percig tartott. A fehérjék megfelelő elkülönítéséhez Hyper PAGE II protein markert használtam (#Bioline, USA).

A semi-dry blot második lépése a transzferálás, amikor az SDS-gélen kapott fehérje sávokat PVDF nitrocellulóz membránra (30 kDa <, #Millipore Immobilon-P pórus méret: 0,45 μ m, 30 kDa >, #Millipore Immobilon-P^{SQ} pórus méret: 0,2 μ m) vittem át transzferáló berendezés segítségével (30V, max I 260-350mA, 30-120 perc #Cleaver Scientific, UK). A transzferálás előkészítése során a membránt aktiválása érdekében 3 percig áztattam metanolban. Az SDS-gélről közben leválasztottam a fedőgél rétegét és a transzfer pufferrel alaposan megnedvesítettem. A membrán aktiválását követően összeállítottam a transzferálási szendvicset, amely a következőképpen nézett ki: (+) szűrőpapír, membrán, gél, szűrőpapír (-). A készülő transzferálási szendvicset folyamatosan nedvesen tartottam a transzfer puffer segítségével, majd a felső szűrőpapír réteg ráhelyezését követően alaposan lehengereztem, eltávolítva ezzel az esetleges rétegek közé szorult levegőbuborékokat.

A transzferálást követően a membránt 2 percig TBST-ben mostam folyamatos rázogatós alatt, majd a blokkolás periódusa következett.

A blokkolás során 5 %-os zsírmentes tejpor és TBST oldatban áztattam 4°C-on 2 órán át a membránt, ezzel blokkolva a nem specifikus kötőhelyeket. Ezt követően az elsődleges ellenanyaggal (TBST és tejpor oldatban, #Santa Cruz BDNF 1:1000) inkubáltam ismét 4°C-on egy éjszakán keresztül. Az elsődleges antitest leöntése után TBST oldatban 3 x 10 perc mosás következett, majd az eddig használt blokkoló oldatban hígított másodlagos antitesttel inkubáltam a membránt szobahőmérsékleten, 1 órán keresztül. Az inkubációs idő lejártakor ismét 3 x 10 perces mosási fázis következett TBST-vel. A röntgen filmen történő detektálást megelőzően kemilumineszcensz szubsztrátot (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, #Thermo Scientific, USA) csepegtettem a membránra, amellyel 5 percig inkubáltam azt. Mivel másodlagos antitestként minden esetben HRP-konjugált (horseradish peroxidase, tormaperoxidáz-konjugált) antitestet használtam (#Jackson 1:10000), a membránra csepegtetett hidrogén-peroxid jelenlétében (a szubsztrátban található) a luminol oxidálódása következik be. A folyamat eredményeként fotonok emittálódnak a megjelölt antitestekről. Az így keletkezett, a röntgen filmen megjelenő fehérjesávok

sötétsége arányos a membránon jelen lévő detektálni kívánt fehérje és a hozzá specifikusan kötődő ellenanyag mennyiségével, amely fekete sávok intenzitását imageJ szoftverrel kvantifikáltam, 'housekeeping' fehérjeként pedig α -Tubulint használtam.

4.6 Statisztikai elemzés

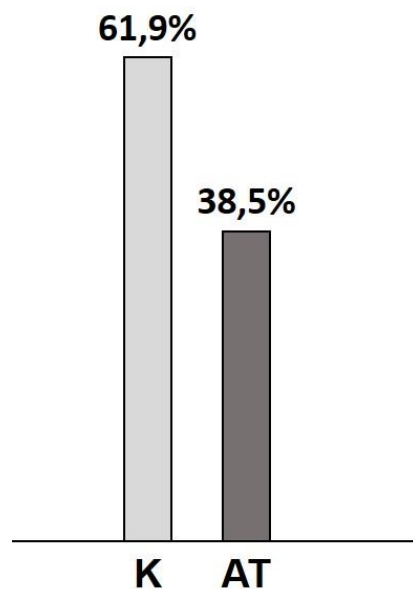
A statisztikailag szignifikáns eltéréseket és összefüggéseket normalitásvizsgálatot követően Statistika 13.2 program segítségével elemeztem. Az analízisek során egy-utas vagy két-utas ANOVA-t használtam (Tukey's *post hoc t*-teszt). Az új tárgy felismerése teszt elemzésekor az 50 %-os véletlen szint és az egyes csoportok összehasonlítására kétmintás *t*-tesztet alkalmaztam. A korreláció analízishez parametrikus korreláció tesztet használtam. A mortalitás mértékének meghatározásához Pearson-féle khinégyszet (χ^2) próbát alkalmaztam. Az adatok szórását \pm SE-ben, minden oszlopdiagramot tartalmazó ábrán feltüntettem. A szignifikancia szintet $p < 0,05$ -ben határoztam meg.

5. Eredmények

5.1 A kísérleti állatok túlélése

Az aktív mozgástréning esetében, az állatok mortalitását tekintve, szignifikáns különbség mutatható ki ($p = 0,0031$) a mozgástréningben részt vett állatok és az inaktív állatcsoport között (10. ábra). A mozgástréningben részt vett patkányoknál a mortalitás mértéke alacsonyabb volt, mint a kontroll csoport állatai esetében. Az elhullás követése a 24 és a 32 hónapos időszakaszban történt, tehát a legidősebb állatcsoportra vonatkozik. A 24 hónapos korig elhullás csak elvétele következett be, értékelésre tehát ez az időszak nem számottevő.

A passzív testedzés (EMF) kísérletei és tesztjei során nem tapasztaltam elhullást.



10. ábra. A mortalitás ábrázolása az aktív testedzés kísérletében.

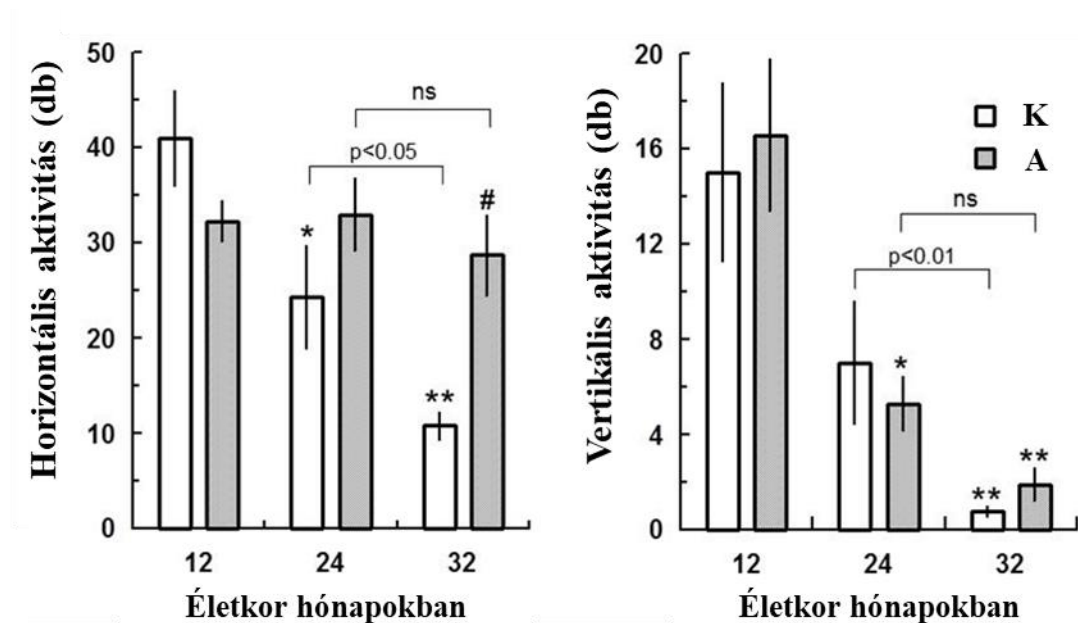
A mortalitás mértéke a 32 hónapos kor eléréséig a mozgástréningben részt vett állatok (AT, sötét szürke) és a kontroll csoport (K, világos szürke) állatainak függvényében (χ^2 próba).

5.2 A magatartás tesztek eredményei

5.2.1 A nyílt porond teszt eredményei - aktív testedzés

Az aktív testedzési protokollt követő nyílt porond teszt eredményei különbséget mutattak ki mind az életkorok, mind pedig a csoportok (aktív és passzív) között (11. ábra). A két utas ANOVA analízis azt mutatta, hogy a horizontális aktivitás az életkor előrehaladtával csökkent ($F_{2,49} = 8,22$; $p < 0,0001$). Továbbá bizonyos tendencia mutatkozott az egyes csoportok között ($F_{2,49} = 3,26$; $p = 0,076$), az életkorok és a csoportok közötti összefüggés azonban magas szignifikanciát mutatott ($F_{2,49} = 5,26$; $p < 0,009$). Ez a figyelemre méltó különbség elsősorban annak tulajdonítható, hogy a horizontális aktivitás az életkorral csökken a nem edző kontroll csoportban, de a fizikai aktivitást végző állatokra ez a hatás nem érvényesül. Ezen kívül a kontroll csoport 24 és 32 hónapos állatainál további, életkorral összefüggő hanyatlás figyelhető meg ($p < 0,05$), amely hanyatlás az edzett csoportra nem jellemző. Ezen eredmények azt mutatják, hogy a krónikus időskori mozgás képes fentartani a horizontális aktivitást. Az aggkorú, 32 hónapos patkányok aktivitása magasabb volt a hasonló korú kontroll csoport állataihoz képest ($p < 0,05$, *post hoc t*-teszt).

A vertikális aktivitás életkor-függő változása a 11. ábra jobb oldali diagramja alapján egyértelmű ($F_{2,49} = 19,8$; $p < 0,0001$), bár a fizikai tréning a horizontális aktivitás esetében nem befolyásolta e hanyatlást. A vertikális aktivitást elemezve, a 24 és 32 hónapos edző patkányokban nem mutatható ki életkor-függő hanyatlás a kontroll 32 hónapos állatokhoz viszonyítva, azonban ezen életkoroknak megfelelő kontroll állatcsoportokban szignifikánsan csökkent a vertikális aktivitás ($p < 0,01$).

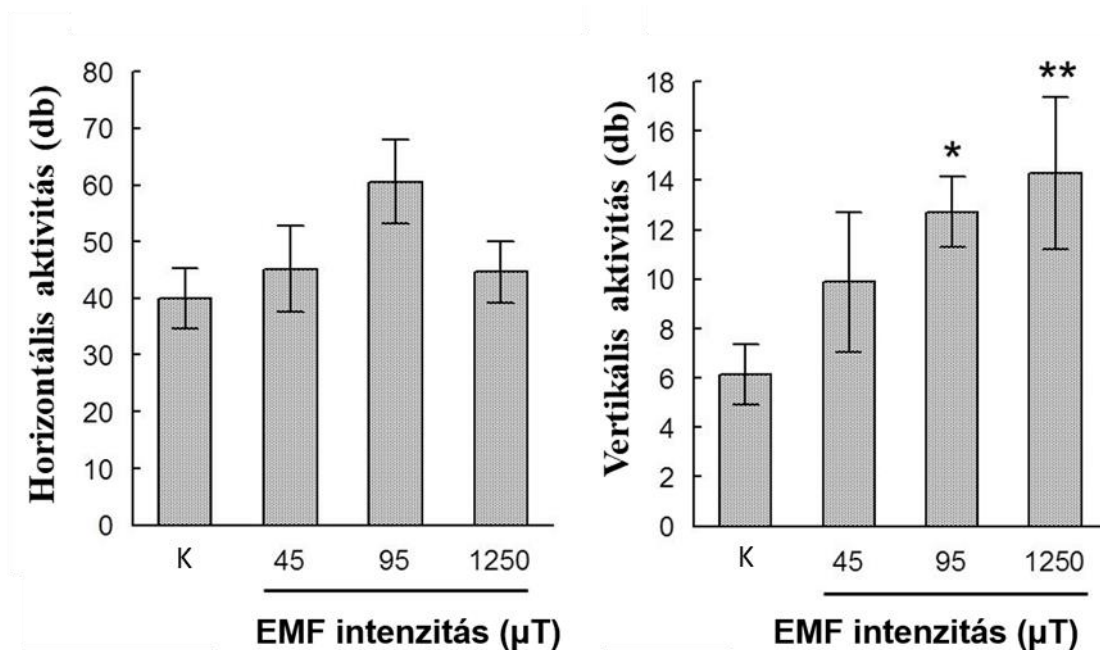


11. ábra. A nyílt porond teszt eredményei.

Az aktív testedzés hatásai a horizontális (határvonal keresztezések száma, bal oldali ábra) és a vertikális (hátsó két lábra állások száma, jobb oldali ábra) aktivitásra három különböző életkorban (12, 24 és 32 hónapos állatok). Az adatok elemzése két utas ANOVA-val történt (*post hoc t*-teszt). Az aktivitás az életkor előrehaladtával szignifikánsan csökkent: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Az aktív testedzésben részesült állatok (A) megtartották a horizontális aktivitásukat mindhárom korcsoportban, amely jelentős különbséget eredményezett a 32 hónapos állatok esetében (# $p < 0,05$ vs. azonos korú kontroll (K) csoport). A horizontális és vertikális aktivitás további csökkenése a 24 és 32 hónapos korban csak a kontroll csoport állatainál volt jelentős, amely statisztikai adatokat az oszlopok feletti vízszintes vonalakon jelöltem. A testedzésben részesült állatok csoportjai között azonban ezekben az életkorokban nem mutatható ki szignifikáns csökkenés (ns).

5.2.2 A nyílt porond teszt eredményei - passzív testedzés

A passzív testedzési protokollt követő nyílt porond teszt eredményei különbséget mutattak ki [$F(3,35) = 3,18$; $p = 0,036$] az EMF terápia 95 μT és 1250 μT dózisában részesülő állatok vertikális aktivitásában a kontroll állatcsoportéhoz képest (12. ábra). A 45 μT dózisú EMF terápia a vertikális aktivitásra hatással volt ugyan, de ezen eredmények nem voltak szignifikánsak. A horizontális aktivitásban nem mutatkozott szignifikáns különbség egyik dózis esetében sem [$F(3,35) = 1,33$; $p = 0,28$], azonban bizonyos fokú tendenciát figyelhetünk meg a mindhárom dózisú, EMF terápiaiban részesülő állatok esetében a kontroll csoport állataihoz viszonyítva.

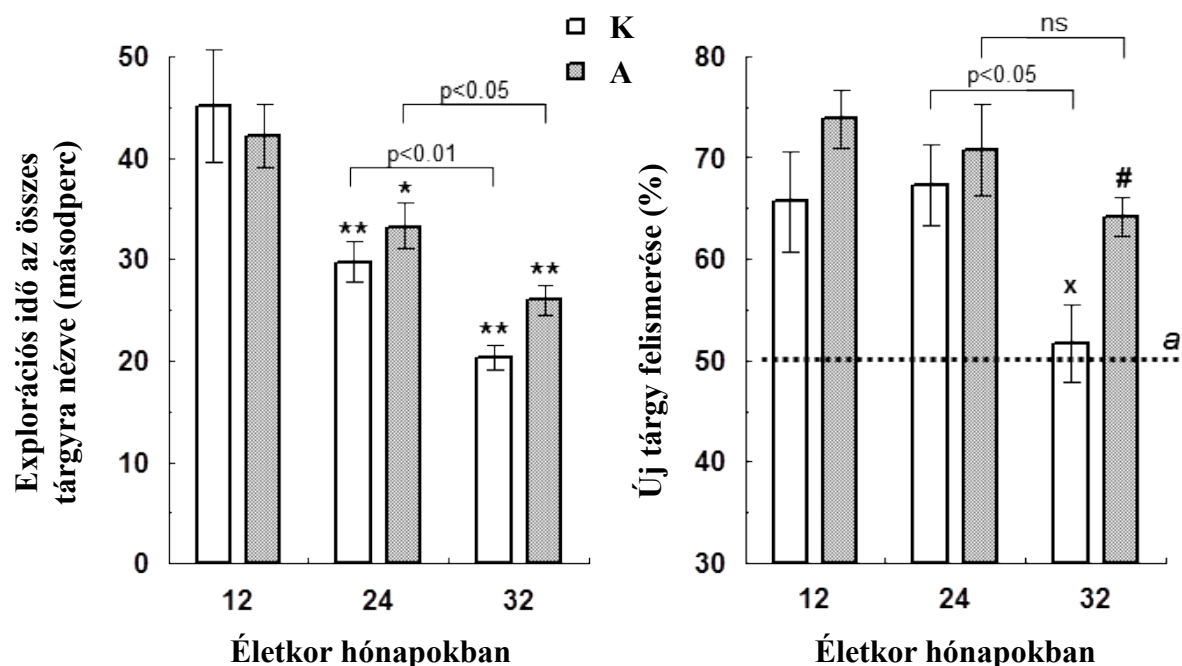


12. ábra. A nyílt porond teszt eredményei 32 hónapos állatoknál.

A bal oldali ábra a horizontális (határvonal keresztezések száma), a jobb oldali a vertikális aktivitást (a hátsó két lábra állások száma) ábrázolja a kontroll csoportban (K), illetve a három különböző EMF kezelésekben részesült állatcsoportokban (45, 95 és 1250 μT). A vertikális aktivitás szignifikánsan nőtt a EMF kezelés hatására (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs. kontroll csoport (K), *post hoc t*-teszt).

5.2.3 Az új tárgy felismerés teszt eredményei - aktív testedzés

Az új tárgy felismerés teszt eredményeit a 13. ábra szemlélteti. Az explorációs aktivitás -amely az összes tárgyra (régi és új) vonatkozó adat-, az életkor előrehaladtával csökkent minden életkorban és csoportban ($F_{2,50} = 27,88$; $p < 0,0001$). A két idősebb állatcsoportot vizsgálva az életkor-függő hanyatlás mértéke közel azonos volt, azonban a 24 és 32 hónapos edző állatok esetében enyhe javulás figyelhető meg ($p = 0,38$; $p = 0,14$; *post hoc t*-teszt) Az új tárgy felismerés eredményei a 13. ábra jobb oldali diagrammján láthatók: a kontroll csoportok közötti, életkorral összefüggő hanyatlás szignifikanciája egyértelmű ($F_{2,46} = 6,19$; $p = 0,017$), míg a testedzést végző patkányoknál csak tendencia figyelhető meg. A 12 és 24 hónapos patkányok összehasonlításakor jól látható, hogy a 24 hónapos állatok a motilitásuk csökkenése ellenére sem veszítették el képességüket az új és régi tárgyak felismerésében. A 32 hónapos kontroll állatok esetében nem mutatható ki meggyőző eredmény a tárgyak felismerését illetően, a felismerési index értékük 50 % körüli volt ($t = 0,32$; $p = 0,75$; $df = 8$; párosított *t*-teszt). Ezen csoport felismerési hányadosa alacsonyabb volt a 24 hónapos kontroll csoporthoz képest ($p < 0,05$). A fizikai testmozgás azonban az idős patkányok esetében (32 hónapos csoport) pozitívan hatott a felismerési képességre, megőrizve azt, illetve különbség mutatkozott a két idősebb korosztályban lévő csoport között, illetve a felismerési képesség összehasonlítható volt az azonos csoportba tartozó 24 hónapos patkányokéval ($p < 0,05$).



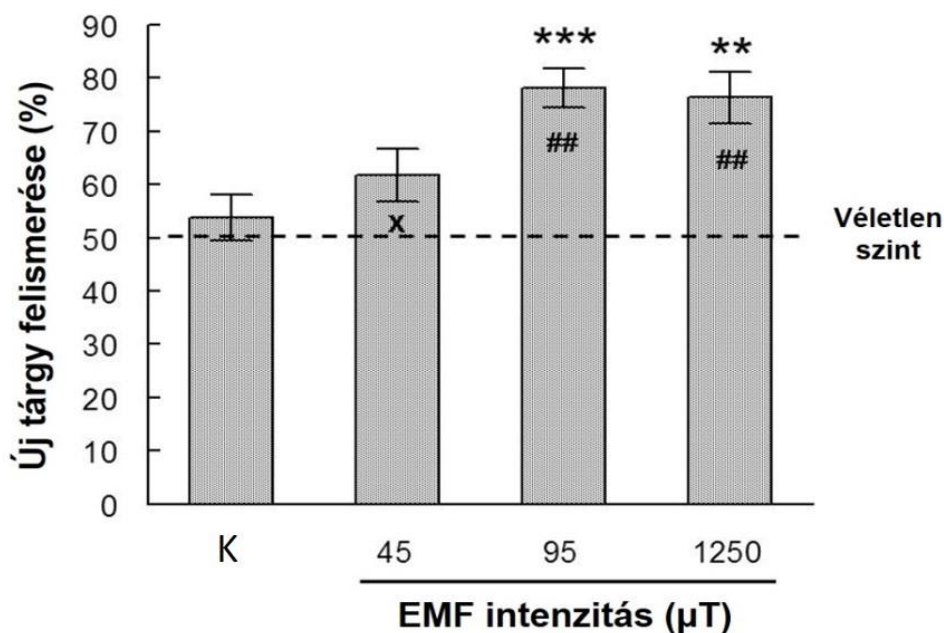
13. ábra. Az új tárgy felismerés teszt eredményei három különböző korcsoportban.

A bal oldali ábra mutatja az explorációs időt az összes tárgyra nézve (másodperc), mindhárom korcsoportban (12, 24 és 32 hó). A jobb oldali ábra az új tárgy felismerési indexet mutatja százalékban kifejezve, szintén mindhárom korcsoportban. Ebben az esetben az 50%-os szintet tekintettük véletlen szintnek (a - pontozott vonal). A 24 és 32 hónapos állatok esetében megfigyelhető az explorációs idő csökkenése (bal oldali ábra), amely egyértelműen összefügg az életkorral (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs 12 hónapos korcsoport, *post hoc t*-teszt). Minden állatcsoport egyértelmű változást mutatott a véletlen szinthez képest, egyetlen kivétel a 32 hónapos kontroll állatcsoport volt ($x_p = 0,75$). További eredmény, hogy a 24 és 32 hónapos kontroll csoportok teljesítménye csökkent ($p < 0,05$), ugyan ezen életkorú aktív csoportokban azonban nem volt életkorral kapcsolatos csökkenés (ns). A 32 hónapos korú, aktív testedzésben részesült állatok szignifikánsan jobban teljesítettek a kontroll állatokhoz viszonyítva ($\#p < 0,05$). A fehér oszlopok a kontroll csoportot (K), a szürke oszlopok az aktív testedzésben részt vett állatok csoportjait jelölik (A).

5.2.4 Az új tárgy felismerés teszt eredményei - passzív testedzés

A pulzáló EMF növelte az új tárgy felismerésének képességet [$F(3,37) = 7,82$; $p = 0,00040$] és hatással volt a régi és az új tárgyat megkülönböztető képességre a közepes ($p = 0,00087$) és magas dózisú ($p = 0,0043$) kezelés esetében (14. ábra). Mivel a diszkrimináció alapvető felismerő képessége csak egyes csoportokban van jelen, a régi és az új tárgyak látogatási aránya lényegesen magasabb 50 %-nál („véletlen” szint). Ennek a kritériumnak a közepes és magas dózisú kezelésben részesülő állatok feleltek meg ($p < 0,001$ közepes és $p < 0,001$ magas dózis esetében az 50 %-hoz viszonyítva). A legalacsonyabb, 45 μT dózis esetében az eredmények nem érték el a szignifikancia szintet ($p = 0,056$). A 13. ábrán látható, hogy a kontroll csoport állatainak eredményei a véletlen szint környékén tetőznek.

A szenzori-motoros képességek (nyílt porond teszt) és a kognitív képességek (új tárgy felismerés teszt) összefüggéseit tekintve az adatok egymással korrelálnak, a vertikális és horizontális aktivitás egyértelműen összefüggést mutatott a kognitív teljesítménnyel ($n = 38$; vertikális: $r = 0,626$; $p < 0,001$; horizontális: $r = 0,407$; $p < 0,05$). Az eredmények alátámasztják tehát a motoros képességek pozitív hatásait a kognícióra nézve.



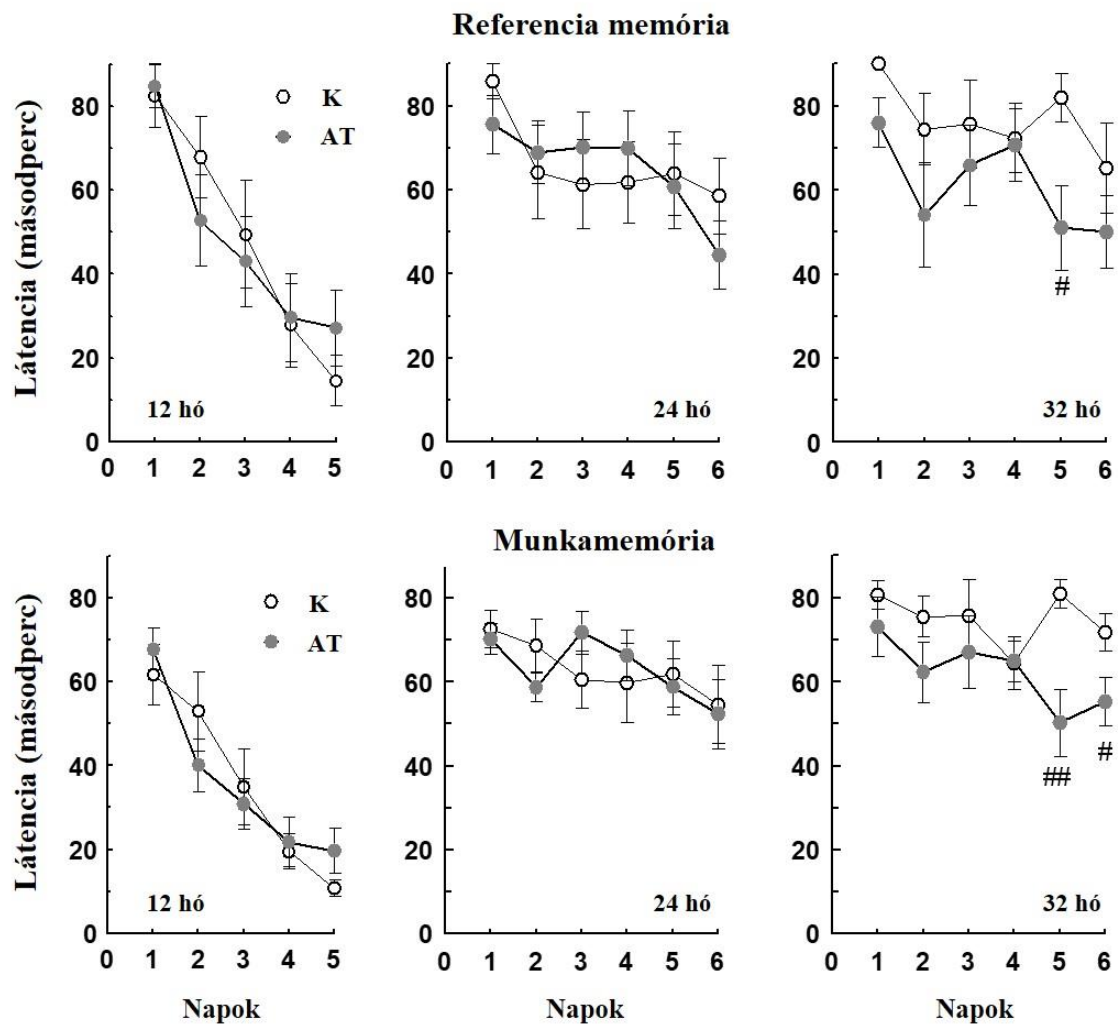
14. ábra. Az új tárgy felismerés teszt eredményei.

A NOR a közepes és a magas dózisú EMF kezelés hatására szignifikánsan emelkedett a kontroll csoport állataihoz képest (** $p < 0,01$ és *** $p < 0,001$). Továbbá az 50 %-os középvonálhoz képest a közepes és magas dózisú kezelést kapott állatok diszkriminációs képessége szintén szignifikánsan nőtt a kontroll csoporthoz (K) viszonyítva ($^{##}p < 0,01$), míg a legalacsonyabb dózisú kezelésben részerült állatok esetében megfigyelt emelkedett érték nem éri el a szignifikancia szintjét ($^xp = 0,056$). A szaggatott vonal a véletlen szintjét jelöli (50 %).

5.2.5 A vízi útvesztő teszt eredményei - aktív testedzés

A tanulási képességek vízi útvesztő tesztben mért eredményeit a 15. ábra mutatja be. Az ismételt mérések varianciaanalízis magas szignifikanciát mutatott ki a 12 hónapos állatok referencia és munkamemóriájában ($p < 0,0001$). Az idősebb életkorokban a tanulási képességek javulása lassabb folyamatot mutatott. A 24 hónapos csoportok esetében a referencia memória fejlődése szignifikánsan jobb volt ($F_{5,110} = 2,42$; $p = 0,040$). A munkamemória esetében a fejlődés közel szignifikáns értékeket mutatott a hasonló korú kontroll csoporthoz viszonyítva ($F_{5,110} = 2,23$; $p = 0,057$). A 32

hónapos patkányok hasonló tendenciát mutattak (RM: $F_{5,75} = 2,42$; $p = 0,043$; WM: $F_{5,75} = 2,32$; $p = 0,051$). A fizikai testedzés hatására bekövetkezett memóriajavulás kizárólag a 32 hónapos állatok esetében mutatható ki a teszt napok és csoportok közötti kapcsolat alapján, a munkamemória esetében ($F_{5,75} = 2,57$, $p = 0,034$). A két csoportra vonatkozó *post hoc t*-próba analízis azt mutatta, hogy a 32 hónapos patkányok a teszt második felében jobban teljesítettek, amely eredmény nem volt szignifikáns. Ez valószínűleg az idős állatok nagyon alacsony teljesítményének tudható be, mivel ezen állatcsoport a teszt napok első felében nem mutatott mérhető tanulási folyamatot. A 32 hónapos állatok esetében továbbá az egyes teszt napokon mutatott teljesítmény markáns variabilitást mutatott. A 15. ábrán látható, hogy az edzett 32 hónapos állatoknál nem lépnek fel ehhez hasonló hirtelen teljesítmény változások, amelyek leginkább a munkamemóriában figyelhetők meg.

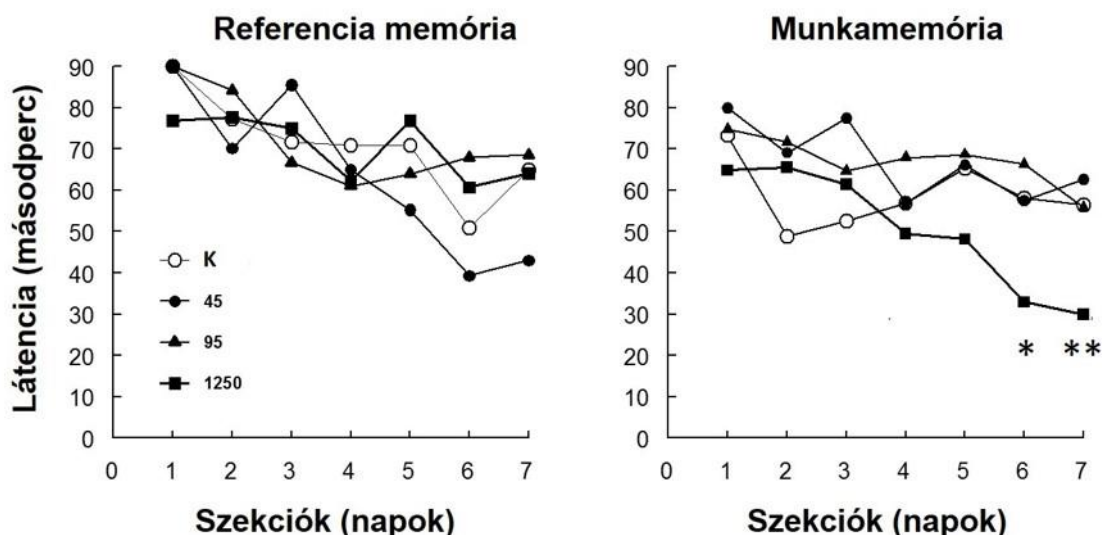


15. ábra. A Morris vízi útvesztő teszt eredményei.

Az ábra felső felében a referenciamemória eredményei, az alsó felében a munkamemória eredményei láthatóak másodpercben kifejezve, a teszt szekcióira (napjaira) lebontva. Az üres kör a kontroll csoportot (K), a szürke kör az aktív testedzésben részt vett állatcsoportokat ábrázolja (AT). A térbeli tájékozódás és tanulás előrehaladása a két legmagasabb korban láthatóan lelassult. A munkamemóriában csak a 32 hónapos korban mutatható ki csoportkülönbség ($\#p < 0,05$, $\#\#p < 0,01$ vs. kontroll csoport, *post hoc t*-teszt).

5.2.6 A vízi útvesztő teszt eredményei - passzív testedzés

A vízi útvesztő teszt eredményeit elemezve megállapítható, hogy a referencia memória javult a szekciók során (ANOVA: $F(6,204) = 7,21$; $p = 0,000001$), habár nem mutatható ki szignifikancia a csoportok között [$F(3,34) = 0,40$; $p = 0,75$]. A munkamemóriát tekintve a látencia ebben az esetben is csökkent a szekciók előrehaladtával (ANOVA: $F(6,204) = 5,11$; $p = 0,000065$), továbbá a memóriaparaméter esetében szignifikáns változás figyelhető meg a csoportok között is: $F(3,34) = 3,30$; $p = 0,032$ (16. ábra). Végezetül a *post hoc t*-teszttel végzett analízis eredményét láthatjuk a 16. ábrán: a legmagasabb dózisban részesülő állatok jobban teljesítettek a kontroll csoportba tartozó társaiknál az utolsó két tesztnapot tekintve ($p = 0,012$ - 6. szekció és $p = 0,0090$ - 7. szekció).



16. ábra. A Morris vízi útvesztő teszt eredményei.

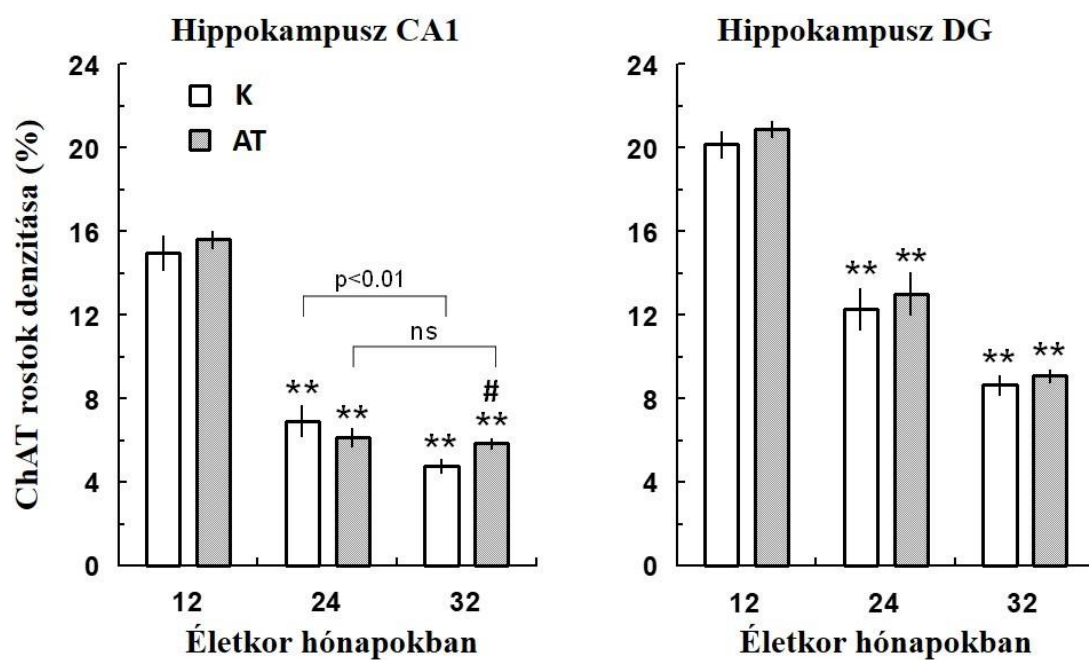
A bal oldali ábra a referencia memóriát, a jobb oldali a munkamemóriát ábrázolja másodpercekben kifejezve és a teszt szekcióira (napjaira) lebontva. A térbeli tájékozódás és tanulás szignifikáns előrehaladása a munkamemóriában mutatható ki az utolsó két napon (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, 1250 μ T vs. kontroll csoport (K). Jelölések: o kontroll, • 45 μ T, ▲ 95 μ T, ■ 1250 μ T.

5.3 Az immunohisztokémiai vizsgálatok eredményei - aktív testedzés

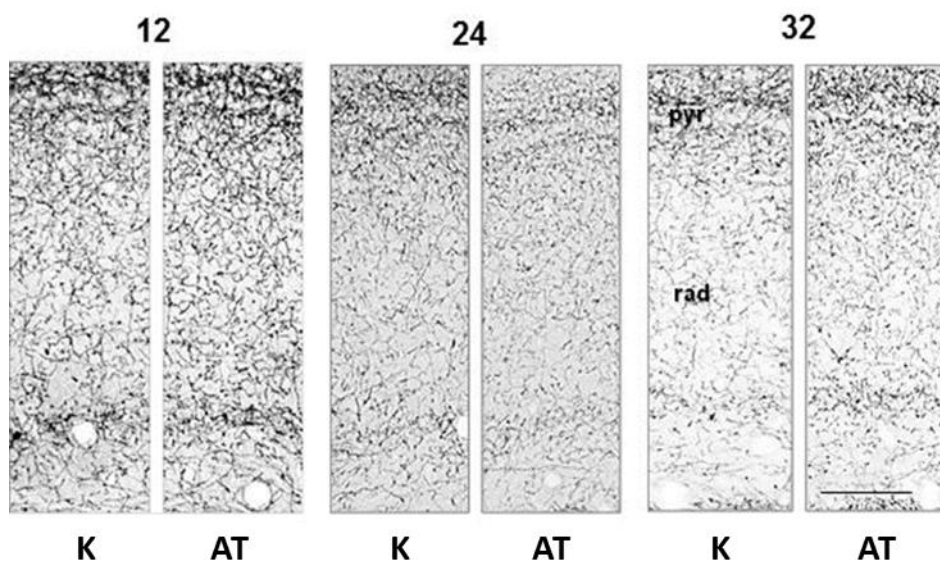
A hippocampusban megfigyelhető a kolinerg rostok denzitásának életkorral összefüggő csökkenése mindhárom vizsgált korcsoportban, a CA1 régióban ($F_{2,37} = 111,4$; $p = 0,0001$) és a DG régióban ($F_{2,37} = 152,7$; $p = 0,0001$) (17. ábra). A reprezentatív hisztológiai képek alátámasztják ezt a markáns hanyatlást minden régióban, a CA1 és a DG területében. A 12 hónapos kontroll állatcsoporthoz viszonyítva az idősebb csoportok hippocampusz régióiban csökkent mennyiségű ChAT pozitív rostdenzitást figyelhetünk meg a kontroll (nem edző) és az edzett csoportokban egyaránt.

A két idősebb életkor összehasonlításával nyilvánvalóvá vált, hogy a CA1 területben a 32 hónapos állatokban megállapítható rostsűrűség további csökkenése nem mutatható ki a 24 hónapos patkányokhoz viszonyítva, mivel a 32 hónapos állatok esetében a fizikai testedzés 24-32 hónapos kor között történt. A kontroll állatok további rostsűrűség csökkenést mutattak.

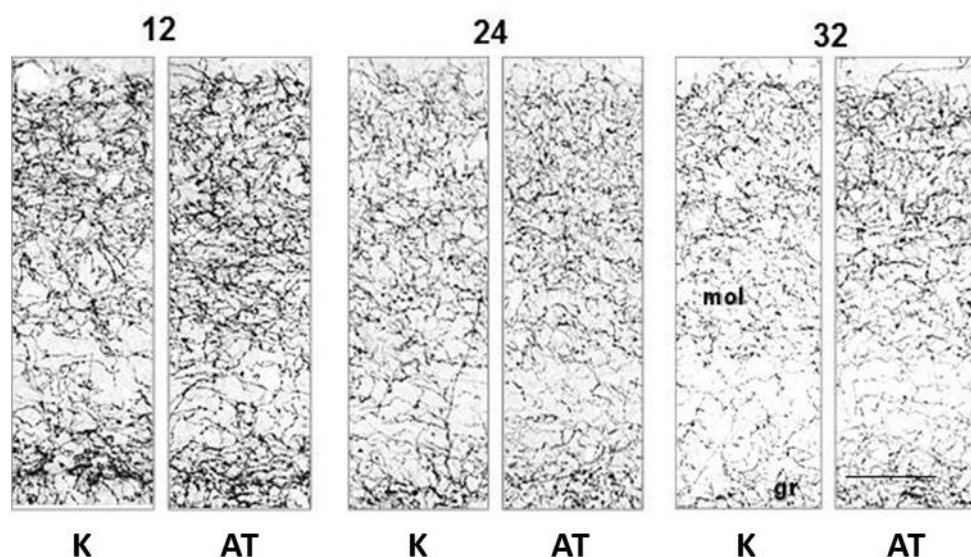
Ezen jelenség a DG területben nem észlelhető. Statisztikailag szignifikáns különbség mutatható ki azonban a két idősebb életkorú kontroll állatcsoportnál a CA1 régióban ($p < 0,01$, 24 vs. 32 hónapos kontroll csoportok), továbbá az edzett állatok rostdenzitása magasabb volt a kontroll csoporthoz képest a 32 hónapos korban ($p < 0,05$).



Hippokampusz CA1 régió



Hippokampusz DG régió



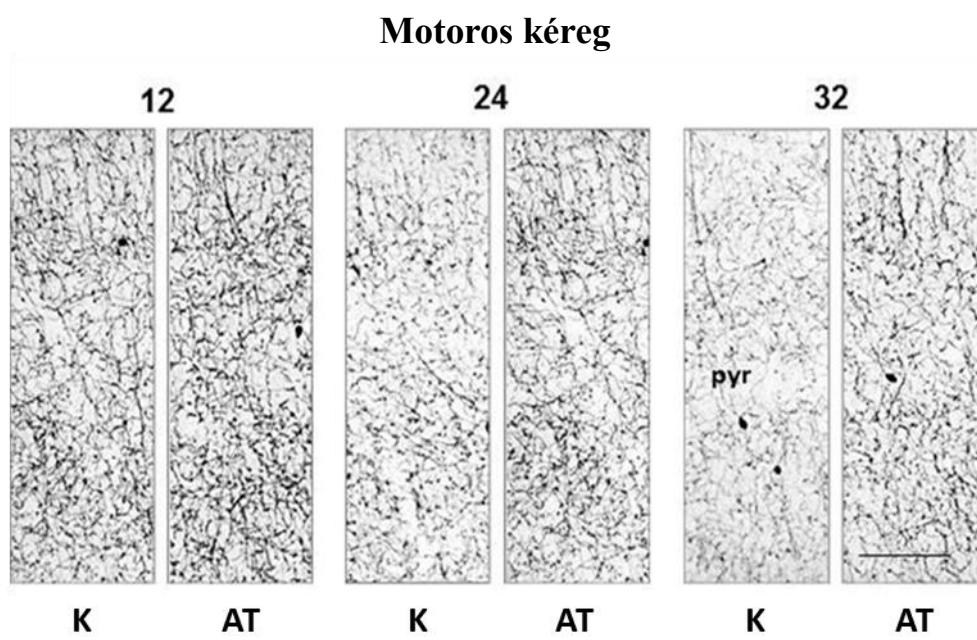
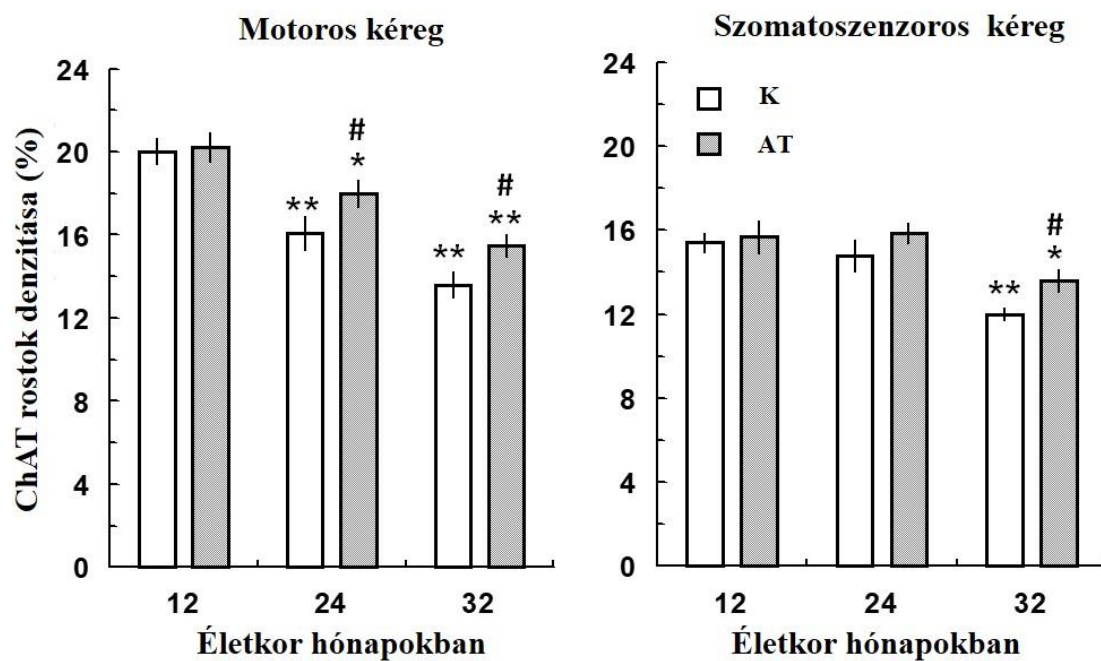
17. ábra. A hippocampusz immonohisztokémiai elemzése.

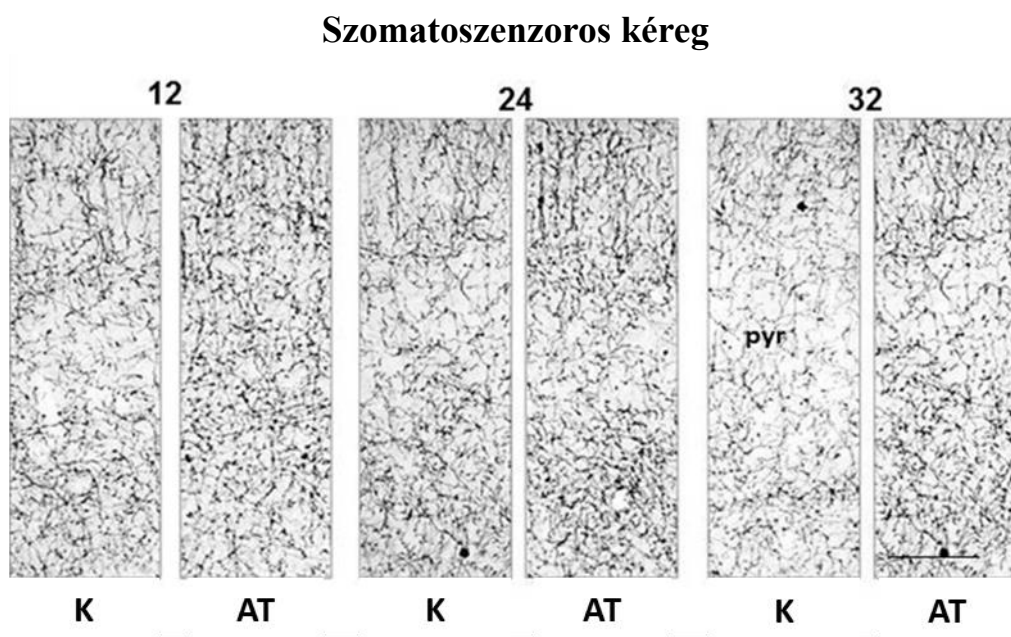
A kolinerg rostok sűrűsége mindkét vizsgált hippocampusz régióban csökkent, mindhárom életkorban (felső ábra, $**p < 0,01$ vs. 12 hónapos állatcsoport, *post hoc* Tukey's teszt). A krónikus testedzés hatása csak a 32 hónapos korban, a CA1 régióban szignifikáns ($\#p < 0,05$, aktív testedző vs. kontroll csoportok). Egyéb, az aktív és a kontroll csoportokra vonatkozó különbségek a 24 és 32 hónapos korcsoportok esetében az oszlopok feletti vízszintes vonalakon vannak feltüntetve. A CA1 és DG területek reprezentatív fotomikrográfiai az oszlopdiagramok alatt találhatóak, mindhárom kontroll és aktív korcsoportból egy-egy minta került feltüntetésre. Rövidítések: pir - piramis réteg, rad - stratum radiatum, mol - molekuláris réteg, gr - szemcsés réteg.

Méretarányok: CA1 100 μm , DG 50 μm .

A ChAT pozitív rostok denzitásának csökkenése figyelhető meg az életkor előrehaladtával az elsődleges mozgató és a szomatoszenzoros kéreg 5. rétegében (MC: $F_{2,43} = 36,0$; $p = 0,0001$; SSC: $F_{2,43} = 14,5$; $p = 0,0001$) (18. ábra alsó szövettani képei, amelyek az V. réteg felső, piramis és infrapiramidális rétegeit mutatják be). A fizikai testedzés hatásának vizsgálata ANOVA analízissel történt: MC, $F_{1,43} = 6,00$, $p = 0,018$; SSC, $F_{1,43} = 4,42$, $p = 0,042$. A testedzés csökkentette az életkorral összefüggő

hanyatlást a motoros kéregben, valamint a 32 hónapos állatok esetében a szomatoszenzoros kéregben ($p < 0,05$, *post hoc t*-teszt).



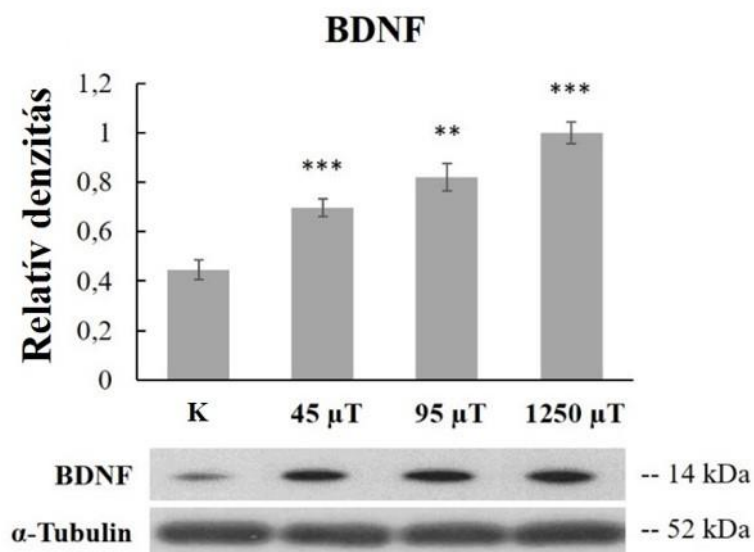


18. ábra. A kolinerg rostsűrűség változása a motoros és a szomatoszenzoros kéregben. A 24 és 32 hónapos állatcsoportok esetében a ChAT rostsűrűség jelentős csökkenése figyelhető meg (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs. 12 hónapos korcsoport, *post hoc t*-teszt) mindkét kísérleti csoportban (K-kontroll, AT-aktív testedzés). A krónikus, aktív testedzés pozitív hatásai mindkét kortikális területen jelentkeztek (# $p < 0,05$ vs. azonos korú kontroll csoportok). A diagramok alatti ábrák egy-egy reprezentatív fotomikrográfot mutatnak be a kontroll és aktív állatok agyainak motoros és szomatoszenzoros kérgében található V. rétegének felső, piramis és infrapiramidális régióiból. A fehér oszlopok a kontroll csoportot (K), a szürke oszlopok az aktív testedzésben részt vett állatok csoportjait jelölik (AT). Méretarány: 100 μm .

5.4 A molekuláris biológia vizsgálatok eredményei - passzív testedzés

Az EMF kezelés szignifikánsan növelte a BDNF szintjét mindhárom dózis esetében ($p = 0,0002$; $p = 0,0035$; $p = 0,00017$) a hippocampusban a kontroll csoport állataihoz viszonyítva (18. ábra). A 45 μT kezelésben részesülő csoport állatainál 33 %-

al, a 95 μ T csoportnál 45 %-al, a legmagasabb dózisonál pedig 55 %-al volt magasabb a BDNF relatív denzitása a kontroll csoport állataihoz képest (19. ábra).



19. ábra. Az EMF kezelés hatásai a BDNF relatív denzitására hippocampusban.

Az EMF terápia növelte a BDNF fehérje mennyiségét a hippocampusban (** $p < 0,01$;

*** $p < 0,001$ vs kontroll (K). A reprezentatív Western blot ábrák a BDNF és az α -

Tubulin immunoreaktivitását mutatják csoportonként egy-egy kiválasztott állat esetében.

6. Megbeszélés

Kutatásom elsődleges célja az volt, hogy tanulmányozzam az aktív és a passzív testmozgás kognitív képességekre (térbeli tanulás és memória, új tárgy felismerés) gyakorolt hatásait idős patkányokban. Kísérleteimben vizsgáltam továbbá az állatok aktivitását nyílt porond teszt segítségével, valamint a hippokampuszban a két testedzési típus hatására bekövetkező változásokat immunohisztokémiai (aktív testedzés) és molekuláris biológiai (passzív testedzés) módszerekkel. Továbbá a hippokampusz agyterülete mellett lehetőségem nyílt a motoros és szomatoszenzoros kéreg immunohisztokémiai vizsgálatára is az aktív testedzéses kísérletek során, amely kísérletekben három korcsoportba tartozó patkányokat vizsgáltam. A passzív testedzés kísérleteiben kizárólag a 32 hónapos, aggkorú állatokat tanulmányoztam, mivel a szakirodalom ebben a témakörben a legszegényebb.

Az aktív testedzéssel kapcsolatos kísérletek azt mutatták, hogy a hosszú távú, mérsékelt intenzitású aerob mozgás támogatóan hat a kognitív teljesítményre, különösen az idősödő életszakaszra (24 és 32 hónapos kor közötti időszak, Téglás és mtsai 2019). A legfiatalabb korcsoportot tekintve a testedzés nem mutatott különösebb hatást, a 18-24 hónapos kor közötti időszak esetében is csak marginális hatásról beszélhetünk. A 24 hónapos állatok motoros kérgében ugyanis megnövekedett a kolinerg rostszűrűség a kontroll 24 hónapos állatcsoportéhoz képest. Az öregedési időszakra vonatkozóan a nyílt porond tesztben figyelemre méltó az az eredmény, hogy horizontális aktivitás korfüggő csökkenést nem mutatott, szemben a kontroll korcsoportú állatok aktivitásának jelentős csökkenésével. Ez a markáns, szignifikáns hatás elsősorban a futópádon végzett edzés hatására megnövekedett fizikai kondíciónak tulajdonítható. Ezen eredmény kiemelkedő, mivel az életkor előrehaladtával szignifikánsan csökken az állatok aktivitása, de ezt a hanyatlást az aktív testedzés képes volt befolyásolni és szinten tartani. A rendszeres edzés a nyílt porond teszt másik típusú motilitási paraméterét, a vertikális aktivitást pozitívan befolyásolta a 32 hónapos állatok esetében, összehasonlítva a 24 hónapos edzett állatcsoporttal. A vertikális aktivitás e két életkorú edzett csoport között tehát nem mutatott korfüggő csökkenést, szemben az inaktív kontroll csoportokkal.

A vízi útvesztő teszt eredményei csak kisebb teljesítménynövekedést mutattak ki a munkamemória és referencia memória esetében, az edzett 32 hónapos állatoknál. A 12 hónapos korcsoporttal összehasonlítva a két idősebb életkorú állatcsoportot, markáns csökkenés állapítható meg a tanulási képességben. Továbbá a 32 hónapos állatoknál jól látható az egyes szekciók (napok) közötti variabilitás. A különböző kognitív tesztek összehasonlításakor a lokomotorikus és úszó aktivitás funkcionális modulátorként viselkednek. Mivel a fél évig tartó testedzés a nyílt porond teszt eredményei alapján szinten tartotta a motoros és koordinációs képességet a 32 hónapos állatoknál, megállapítható, hogy a motoros képességek támogatóan hatnak a térbeli tanulási képességre a vízi útvesztő tesztben. Forster és munkatársai (1996) korábban már leírták az agyi kognitív és motoros szabályozási funkciók közötti szoros interakciót rágsálókban, továbbá ismert az explorációs és a lokomotorikus intenzitás összefüggése is idős patkányokban (Gage és mtsai 1984).

Ismert továbbá, hogy a motilitás kevésbé befolyásolja a vízi útvesztő teszt teljesítményét. E paradigma tudatában vizsgáltam a testedzés hatásait az öreg életkorban a másik kettő korcsoporthoz viszonyítva. A kontroll öreg állatoknál jelentkező hanyatlást a testedzés láthatóan ellensúlyozta. Az inaktív kontroll állatok tehát nem mutattak diszkriminációs képességet a régi és az új tárgy megkülönböztetése során, azaz a teljesítményük a felismerés véletlen szintjén maradt. Az edzett patkányok jól teljesítettek a tesztben. A másik viselkedési paradigmát tekintve annak ellenére, hogy az életkorral kapcsolatos teljesítménycsökkenés nyilvánvaló volt, a krónikus testmozgás nem befolyásolta az állatok explorációs idejét az összes tárgyra nézve. Összefoglalva az edzés csak az új tárggyal kapcsolatos szelektív figyelmet javította. A fenti magatartási eredményeket elemezve úgy tűnik, hogy a krónikus testmozgás legszembetűnőbb kognitív hatása a 32 hónapos életkorban figyelhető meg az új tárgy felismerés tesztben. Korábbi tanulmányok alátámasztják azt a nézetet, hogy a hippocampusnak elengedhetetlen szerepe van a memóriában rágsálók esetében (Cohen és mtsai 2013, Cohen és Stackman 2015), ugyanakkor a kolinerg funkció ismételten kapcsolódik az új tárgyak felismerésének teljesítményéhez patkányokban (Melichercik és mtsai 2012, Vieira-Brock és mtsai 2015).

A kolinerg neurotranszmisszió alapeleme a kolin acetiltranszferáz, amely az ingerületátvitel egyik nélkülözhetetlen elemét, az acetil kolint szintetizálja a kolinerg

végkészülékekben. Az acetilkolin szintjének csökkenéséről Alzheimer és Parkinson-kóros agyban több nemzetközi tanulmány is beszámolt (Dringenberg 2000b, Bohnen és Albin 2011). Ezen neurodegeneratív betegségek acetilkolin szintjének redukálódását feltételezhetően a neurogenesis, a kolinerg neuronok károsodása és egyéb, az agyi területekben történő sejtjelek szignalizációs útvonalak károsodása vagy lassulása okozza. Az idősödő agyban lejátszódó folyamatok hasonló kórlefolyást mutatnak: az agy tömege idővel csökken, a neuronális aktivitás hanyatlása és az idegsejtek atrófiája figyelhető meg (Šimić és mtsai 1997, Madden és mtsai 1999, Reuter-Lorenz és mtsai 2000, Miller és mtsai 2008). Ezen okokból kifolyólag arra következtethetünk, hogy az acetilkolin szint csökkenésének oka valószínűleg a csökkenő kolin acetiltranszferáz enzim mennyisége. Az aktív testedzés kísérleteiben arra kerestem a választ, hogy csökken-e a kolin-acetiltranszferáz szintje az agyban, idős patkányokban és ezt az esetlegesen csökkenő enzimszintet képes-e a testedzés befolyásolni. Az emlős agyi neokortex és hippocampusz kolinerg beidegződése a bazális előagy és a mediális szeptális régióban található kolinerg sejtszövetekből ered. Ezeknek az útvonalaknak az anatómiai szerveződését különböző módszerekkel vizsgálták, így például acetil-kolinészteráz és a kolin-acetil-transzferáz kolinerg markerekkel (Kása és mtsai 1997). Jelen tanulmányban a hippocampuszt és az elsődleges motoros és szomatoszenzoros kérget területét választottam ki, hogy ezekben az agyi régiókban vizsgáljam a mérsékelt intenzitású futópados gyaloglás hatásaira a leírt neurotranszmitterek funkcióit. Az eredmények azt mutatták, hogy a ChAT pozitív rostok sűrűsége az életkor előrehaladtával csökkent, különösen a vizsgált hippocampusz területeken. A krónikus testmozgás ellensúlyozta ezt a negatív hatást, elsősorban a CA1 régióban a 32 hónapos idős állatok esetében, valamint ugyanez a hatás mutatkozott mindkét neokortikális területen. Ezek az eredmények ismét azt támasztották alá, hogy mérsékelt intenzitású mozgás kifejezetten hatékony az idős életkorban. A humán és állatkísérletes szakirodalmi tanulmányok alapján jól ismert, hogy az acetil-kolint termelő ChAT enzim aktivitása jelentősen csökken mind az agykéregben, mind a hippocampuszban az öregedés során (Perry 1980, Gaykema és mtsai 1992, Nyakas és mtsai 2011, Luiten és mtsai 2013). Benichou (2011) kimutatta, hogy az életkorral kapcsolatos kognitív és viselkedési hiányosságok részben az agyi acetil-kolin szint csökkenéséből adódnak. Jelen tanulmányban azt feltételeztem, hogy az acetil-kolin szintézisének kulcsfontosságú enzime, a ChAT

szintézisét és transzportját a rendszeres fizikai testedzés segíti, mivel a ChAT immunreaktív rostsűrűséget a Quantimet 600HR képelemző program segítségével mértem a festési intenzitás küszöbértékén.

Széles körben elismert tény, hogy a testmozgás preventíven hat az Alzheimer-kór kialakulására, illetve lassítja a betegség előrehaladását (Geda és mtsai 2010, Abe 2012, Karceski 2012, Norton és mtsai 2014), továbbá fontos szerepe van az amigdalában és a hippocampusban található idegsejtek Alzheimer-kórral kapcsolatos degeneráció elleni védelmében (Lin és mtsai 2015a). A humán vizsgálatok (Abbott és mtsai 2004, Hillman és mtsai 2008, Erickson és mtsai 2011a) és az állatkísérletek (Buzsáki 2005) alapján megállapítható, hogy a kognitív és a motoros agyterületek funkcionálisan kapcsolódnak egymáshoz és a fizikai testedzés támogatja a kognitív teljesítményt.

A jelenlegi kísérleti eredmények tükrében arra a következtetésre jutottam, hogy a testmozgás a patkányok öregedési időszakában a leghatékonyabb, amikor egyébként mind a motoros, mind a kognitív funkciók nagymértékben károsodnának. Ez a következtetés összhangban van más szerzők eredményeivel, akik leírták, hogy a kognitív teljesítmény fokozatosan csökkent az átlagos várható élettartam körüli időszaktól, amely a Fischer 344 x Brown Norway hibrid törzsben 33-36 hónapos kor körül van (Van der Staay 2006). Az is megemlíteném továbbá, hogy kísérleteimben mérsékelt intenzitású futópados edzést alkalmaztam, amely az eredmények szerint elegendő az idős állatok fizikai állapotának fenntartásához. Ismeretes, hogy az öregedés során a mérsékelt intenzitású edzés hatékonyan ellensúlyozza az agyi öregedést, illetve a lézió indukált kognitív hanyatlást (Azimi és mtsai 2018, Tsai és mtsai 2018). Feltételezhetjük, hogy ez az intenzitási szint azonban kevésbé befolyásolja a fiatalabb vagy középkorú patkányok fizikai állapotát, mint azt a jelen kísérletben megfigyeltem. A kísérleteimben alkalmazott edzésintenzitás tehát az öregedési folyamat során hatékony, de a fiatalabb korosztályoknál nagyobb intenzitásra van szükség a motoros rendszerek funkcionális kapacitásának növelése érdekében.

Összefoglalva, patkánykísérletekben a mérsékelt intenzitású krónikus testmozgás előnyös a kései öregedés időszakában, különösen a jelen eredmények által igazolt öregedési időszakban. Mindkét esetben az új környezetben vizsgált motoros aktivitás és a különböző tanulási-memória tesztekben egyértelmű hatást csak az öregedő állatokban

lehetett elérni a többi korcsoporthoz képest. A ChAT rostsűrűség növekedése részben a kognitív teljesítményben, valamint a motoros viselkedésben tapasztalt javulás alapját képezheti.

Jelen tanulmány másik célja egy krónikus alacsony frekvenciájú elektromágneses tér stimuláció biológiai hatásainak feltárása volt öregedő patkányok kognitív és pszichomotoros viselkedésének tanulmányozásával. Az eredmények azt mutatták, hogy az EMF kezelés számos magatartásbeli reakciót idézett elő, így a vertikális aktivitás növekedését nyílt területen, az új tárgy felismerés tesztben jobbnak bizonyult a diszkriminációs viselkedés, a vízi útvesztő tesztben a térbeli tanulás és munkamemória javult a legmagasabb intenzitású EMF kezelés hatására (Téglás és mtsai 2018). Ezek az eredmények erősen arra utalnak, hogy mind a spontán viselkedés új környezetben, mind a kognitív képességek javíthatók. Jelen disszertációban a 30-32 hónapos korcsoportot választottam ki patkányokban, amely egyedülálló időszak az életkori viselkedés és a testmozgás által okozott magatartásváltozások tanulmányozásához az irodalomban. Ezen túlmenően ebben az életkorban patkányoknál számos egyedülálló fizikai és mentális jellemző hasonlít az emberben megegyező életkorban tapasztaltakhoz, így módon ez a kísérleti állatmodell transzlációs modellnek tekinthető. Számos tanulmány hangsúlyozta, hogy a testmozgás támogatja a tanulást és a memóriát, beleértve a térbeli tanulást az idős patkányokban (van Praag 2005, 2009b, Albeck és mtsai 2006), bár néhány vizsgálatban nem találtak semmilyen hatást (Barnes és mtsai 1991). Ezekben a kísérletekben főként futópados edzést alkalmaztak. A pulzáló EMF kezelési protokoll alkalmazása vizsgálataimban a fizikai testedzés passzív típusának tekinthető. Egyes humán esetekben szükség van ilyen jellegű edzés biztosítására az idősebbek számára, különösen mozgási nehézségek vagy teljes mozdulatlanság esetében.

A passzív testedzéssel kapcsolatos kísérletek során elvégzett új tárgy felismerés teszt eredményei azt mutatták, hogy a két nagyobb dózisú (95 és 1250 μ T) EMF kezelés szignifikánsan növelte a passzív testedzésben részt vett állatok figyelmét és rövid távú memóriáját. A kontroll csoport állatai hasonló értékeket mutattak az aktív testedzésben részt vevő 32 hónapos aggkorú állataikhoz viszonyítva: az 50 %-os véletlen határérték körüli eredményt produkáltak.

A nyílt területen végzett spontán aktivitás (nyílt porond) teszt során nem találtam jelentős növekedést a horizontális aktivitásban, amelyet a négy lábon lévő sétálás jelentett, azonban a vertikális aktivitás a közepes és a magas EMF intenzitással végzett kezelés után fokozódott. Bizonyított, hogy az öregedés során, különösen a 30 hónapos kor utáni időszakban a vertikális aktivitás intenzívebben csökken, mint a horizontális aktivitás (Barth és Mody 2014). Feltételezhető, hogy a hátsó lábakra történő felemelkedéshez szükséges izomerő az öregedés során csökken a legintenzívebben, amely egyértelműen a hátsó végtagok motoros szabályozásának romlását eredményezi (Baehr és mtsai 2017). Van der Zee és munkatársai (1990) bebizonyították, hogy az idős patkányok hátsó végtagmozgása jelentősen romlott különösen 2 éves kor után. Leírták továbbá, hogy a csökkentett maximális erő kifejtés az izomtömeg minimális változásai ellenére a hátsó lábtartás romlását idézte elő az idősebb patkányokban (Horner és mtsai 2011). Jelen kísérletben feltételezhető, hogy az EMF kezelés elsősorban a hátsó láb izomerejét és / vagy mozgáskoordinációját növelte, amely a vertikális aktivitás nyilvánvaló növekedéséhez vezetett. További tanulmányok szükségesek azonban annak vizsgálatára, hogy az EMF stimuláció miként befolyásolja az izomszilárdságot és a tömeget, valamint a neuromuszkuláris funkciókat.

Az új tárgy felismerés tesztben a régi (ismert) és az új tárgy felismerése a két magasabb dózisban egyenlő hatékonyságot mutatott a diszkriminációs tanulási magatartás fokozására. A kontroll állatok nem tudtak különbséget tenni az új és régi tárgyak között, ami ebben a nagyon öreg (32 hónapos) korban gyakori jelenség. Mások azt is kimutatták, hogy a hosszú távú vizuális tárgyfelismerő memória nem mutatható ki 25-27 hónapos Wistar patkányokban (Platano és mtsai 2008). Jelen vizsgálatban az új tárgyat felismerő teljesítmény dóziszfüggő javulása egyértelműen kimutatható volt. A szakirodalmi adatok szerint az új tárgy felismerés képessége kifejeződik a munkamemóriában, amelynek központja a prefrontális kéreg. Ennek az agyi területnek más ismert az a tulajdonsága, hogy összekapcsolja a motoros és kognitív agyi funkciókat a munkamemória szabályozása által (Funahashi 2017).

A Morris vízi útvesztő tesztet széles körben alkalmazzák a patkányok térbeli tanulásának és memóriájának kiértékelésére (Morris 1984b, Tomás Pereira és Burwell 2015). Az egyik lehetőség erre a referencia és a munkamemória vizsgálata, amelyet kísérleteimben én is alkalmaztam. Habár az egymást követő napok során a csoportok

között jelentősen javult mind a referencia, mind a munkamemória, a kezelési hatás csak a legmagasabb intenzitású dózisa, a teszt második szakaszára korlátozódott a munkamemóriát vizsgálva. A referencia memóriában nem volt szignifikáns javulás egyik csoportban sem. A viszonylag mérsékelt hatás magyarázatához a kísérleti protokoll több paraméterét is figyelembe kell venni. Előfordulhat, hogy magasabb számú EMF stimuláció szükséges a kísérletek során, mivel jelen protokollban hetente három kezelést kaptak az állatok. Továbbá csak kétféle vízi útvesztő tesztet alkalmaztam hetente (az EMF kezelés nélküli napokon), amely lelassíthatta a térbeli tanulást a hosszú távú intervallumok miatt.

Korábban már megfigyelték, hogy a térbeli tanulás teljesítménye csökken a 24-28 hónapos korú állatoknál (McQuail és mtsai 2011, Hovens és mtsai 2015), megerősíti azt a feltételezést, hogy a patkányok öregedése kognitív zavarokkal jár, valamint az idős állatok a kognitív hanyatlás transzlációs modelljeként kiválóan alkalmazhatók. Alzheimer-kóros rágcsláló modellekben és idős állatokban a tanulás és memória gyengülése már ismert, néhány kutatócsoport bebizonyította az EMF kezelés memóriára gyakorolt pozitív hatásait idős Alzheimer-kóros egerekben (Arendash 2016) és felnőtt Alzheimer-kóros patkányokban (Akbarnejad és mtsai 2017). Egy másik tanulmányban a hippocampusz neurotoxin általi sérülését idézték elő és kimutatták, hogy az EMF stimuláció a sérülés ellenére is fokozta a térbeli tanulást és a memóriát a vízi útvesztő tesztben (Sakhaie és mtsai 2017). Egy további kísérleti munka során kiderült, hogy az EMF kezelés fokozta a regenerációt a perifériás idegrendszeri károsodás után (Zienowicz és mtsai 1991).

A teszteredményeket elemezve összefüggést találtam a szenzoros és motoros képességek (nyílt porond teszt) és a kognitív képességek (új tárgy felismerés és vízi útvesztő teszt) között. A vertikális mozgási képesség, ezen belül a hátsó két lábra emelkedések száma korrelált mindkét kognitív teszt eredményeivel. Humán vizsgálatokban már kimutatták a szenzori-motoros és kognitív funkciók közötti kapcsolatot (Li és Lindenberger 2002). Klinikai tanulmányok bizonyították, hogy az EMF kezelés hatékony a szklerózis multiplex (Sandyk 1997), az Alzheimer-kór (Sandyk 1994) és a Parkinson-kór kezelésében (Sandyk 1999).

Összefoglalva, a passzív testedzés kísérleteiben a krónikus EMF kezelést alkalmaztam aggkorú, 32 hónapos patkányokban az egészséges öregedés támogatására szolgáló transzlációs modell kifejlesztése érdekében, a pszichomotilitás fokozása és a kognitív hanyatlás enyhítése céljából. Az eredmények azt mutatták, hogy az EMF expozíció új környezetben fokozta a mozkékonyságot, könnyebb volt főként a hátsó két lábra állás, amely alátámasztja azt az elképzelést, hogy a hátsó lábak izomereje megnövekedett a kezelés hatására. Másrészt a kognitív funkciók, mint például a tárgyfelismerés és a térbeli tanulás fokozódott ezekben az idős patkányokban, amelyek megerősítik a diszkriminációs és a tanulási magatartás javulását.

A testmozgás hatással van az agyban termelődő fehérjékre is, bizonyítottan növeli a BDNF mennyiségét a hippokampuszban (Berchtold és mtsai 2010, Lee és Soya 2017), amely az első számú agyi eredetű neurotrofikus faktor. Szignalizációs útvonalai rendkívül szerteágazóak, ebből kifolyólag hatással van a szinaptikus plaszticitásra, a neuronális túlélésre, növekedésre és differenciációra. A testedzés hatására bekövetkező, megemelkedett BDNF szintézis összefüggésbe hozható a szinaptikus plaszticitással és a sejtek túlélésével (Mattson és mtsai 2004, Mora és mtsai 2007). Kísérleteimben mindhárom intenzitású EMF kezelésben részesülő állatcsoport esetében kimutattam a BDNF mennyiségének növekedését, amely eredmények korrelálnak az új tárgy felismerés teszt eredményeivel. Ezen eredmények összefüggést mutattak Jin és munkatársai (2017b) által végzett kutatással, amely során 6 hét futópados testedzést követően nőtt a BDNF mennyisége a hippokampuszban. A fentiek alapján feltételezhető, hogy a BDNF támogatóan hat az egészséges öregedésre. A korfüggő neurodegeneratív betegségek kialakulására kifejtett preventív hatását korábban már leírták (Mattson és mtsai 2004). Az EMF kezelés hatásai a BDNF tekintetében még szinte ismeretlenek, ebben a témában jelenleg egy nemzetközi közlemény érhető el, amely *in vivo* vizsgálatban mutatta be a BDNF megnövekedett expresszióját (Li és mtsai 2014).

7. Következtetések

A Célkitűzések fejezetben részletezett hipotéziseimre a következő válaszokat kaptam:

A1. A krónikus aktív testmozgás javította a kísérletben részt vevő 32 hónapos patkányok rövid távú memóriáját a NOR tesztben. Az aktív testedzést végzett állatok e csoportjának eredményei szinte azonosak voltak a 24 hónapos állatok ugyanezen csoportjával.

A2. A referencia- és munkamemória vizsgálatára irányuló MWM tesztben a 32 hónapos állatok jobban teljesítettek a kontroll csoporthoz képest, tehát javult a térbeli tanulási képesség és a memória a krónikus aktív testedzés hatására.

A3. A rendszeres testedzés pozitívan befolyásolta a kísérleti állatok edzett csoportjainak horizontális aktivitását, az életkorral összefüggő hanyatlás nem érvényesült az edzett csoportokban, valamint a 32 hónapos fizikai testedzést végzett állatok aktivitása magasabb volt a kontroll csoporthoz képest. A vertikális aktivitás esetében a korfüggő hanyatlást a testedzés nem befolyásolta.

A4. A hosszú távú testmozgás képes volt pozitívan befolyásolni a csökkenő kolin acetiltranszferáz szintet, ezáltal hat a kolinerg neurotranszmisszióra időskorban, az agy egyes mozgásért és memóriáért felelős területeiben.

B1. A krónikus EMF terápia javította az idős patkányok rövid- és hosszútávú memóriáját a két magasabb dózis (95 és 1024 μ T) esetében.

B2. A rendszeres EMF terápia befolyásolta az idős patkányok térbeli tanulási képességét.

B3. A krónikus EMF terápia pozitív hatást gyakorolt a horizontális és vertikális aktivitásra idős patkányokban.

B4. Az EMF kezelés növelte a BDNF mennyiségét a hippocampusban.

Összefoglalva, patkánykísérletekben a mérsékelt intenzitású krónikus testedzés előnyösen hatott az öregedés időszakában, különösen a fenti eredményeknél tárgyalt öregedési időszakban. Az új, idegen környezetben tanulmányozott motoros aktivitás és a különböző tanulási-memória tesztekben egyértelmű hatást csak az öregedő állatokban lehetett elérni a többi korcsoportéhoz képest. A ChAT pozitív denzitású rostok mennyiségének növekedése részben a kognitív teljesítmény és a motoros viselkedésben tapasztalt javulás alapját képezheti.

A tanulmány második részében a krónikus pulzáló EMF stimulációt 32 hónapos korú öregkorú patkányok esetében alkalmaztam az egészséges öregedés támogatására szolgáló transzlációs modell kifejlesztése, a pszichomotilitás fokozása és a kognitív hanyatlás enyhítése érdekében. Az eredmények azt mutatták, hogy az EMF expozíció az új, idegen környezetben fokozta a mozgékonyt. Főként a hátsó lábak felemelkedésének száma nőtt, ami alátámasztja azt az elképzelést, hogy a hátsó lábak izomszilárdsága megnövekedett. Másrészt a kognitív funkciók, mint például a tárgyfelismerés és a térbeli tájékozódásos tanulás is fokozódtak az EMF stimuláció hatására az öregedő patkányokban, amelyek a diszkrimináció és a tanulási magatartás javulását támogatják. Az EMF kezelés hatásait öregedő patkányok hippocampusában korábban még nem vizsgálták. Eredményeim továbbá azt mutatták, hogy az EMF kezelés növelte a BDNF fehérje mennyiségét a memóriáért és a tanulásért felelős agyi régióban.

8. Összefoglalás

Az aktív testedzést nagy általánosságban a kognitív képességek fenntartására és az életkorral kapcsolatos kognitív hanyatlás megakadályozására irányuló stratégiának is tekintik. A jelen vizsgálatban különböző életkorú (12, 24 és 32 hónapos) Wistar patkányokat 6 hónapos megelőző, mérsékelt intenzitású futópados gyorsgyaloglásnak vetettem alá. Az állatok horizontális és vertikális aktivitását a nyílt porond tesztben (OF), a kognitív funkciókat a Morris vízi labirintusban (MWM), a figyelmet az új tárgy felismerés tesztben (NOR) vizsgáltam. Mivel a tanulás és a memória szoros kapcsolatban áll a kolinerg funkciókkal, az állatok feláldozását követően a ChAT rostsűrűséget a hippocampusban, valamint a motoros és a szomatoszenzoros kérgi területeken analizáltam. Ezen agyi területeken elvégeztem a ChAT-pozitív rost-aberrációk neuropatológiai markerként történő meghatározását is. Eredményeim azt mutatják, hogy a horizontális aktivitás minden életkorban megtartott volt a passzív csoportokhoz képest. MWM tesztben a térbeli tanulási képesség és különösen a NOR teljesítmény csak a 32 hónapos állatok esetében javult a testmozgás hatására. A kolinerg neuronális beidegzéssel kapcsolatban az általános életkorhoz köthető csökkenés mellett a hippocampusz CA1 területén és a motoros kéregben a ChAT rostsűrűség fokozódott, különösen a 32 hónapos edzett csoportban. A vizsgálatok eredményei alapján elmondható, hogy az összes agyi vizsgált területen egyértelműen csökkent a ChAT rost-aberrációk mértéke. Az eredmények azt sugallják, hogy a mérsékelt intenzitású krónikus testedzés patkányok esetében különösen előnyös az öregedés első szakaszában.

Összefoglalva, a krónikus aktív testmozgás csökkentette a kognitív és motoros viselkedések életkor-függő hanyatlását, valamint az életkorral összefüggő kolinerg rostcsökkentést.

A passzív testedzés hatékony terápiás célpont lehet a fizikai és szellemi teljesítmény javítása érdekében. A jelen tanulmányban a krónikus, alacsony frekvenciájú elektromágneses tér stimulációt (EMF) alkalmaztam öregedő patkányoknál annak érdekében, hogy tisztázzam a kognitív és motilitási funkciókhoz kapcsolódó viselkedési hatásokat. Hím 30-32 hónapos korú Wistar patkányokat 6 héten át, hetente háromszor, alkalmanként 24 percig kezeltem EMF terápiával. A stimulációs intenzitás 45 és 1250 μT között változott. A pszichomotilitást a nyílt porond tesztben (OF), az új objektum figyelő képességet az új tárgy felismerés tesztben (NOR), a térbeli tanulást a Morris víz labirintus tesztben (MWM) vizsgáltam. Az eredmények kimutatták, hogy az EMF stimuláció fokozta a vertikális motilitást, azaz növekedett a hátsó két lábra állások gyakorisága a kontroll csoporthoz képest. A kognitív vizsgálatok során az EMF expozíció nőtt a figyelem alapú NOR tesztben és megkönnyítette térbeli tanulást az MWM tesztben, szemben a passzív kontroll csoporttal.

Összefoglalásként tehát elmondható, hogy az EMF-stimuláció támogatta kognitív és pszichomotoros funkciókat aggkorú patkányokban.

9. Summary

Physical exercise is now generally considered as a strategy to maintain cognitive abilities and to prevent age-related cognitive decline. In the present study, Wistar rats were subjected to moderate intensity treadmill exercise for 6 months prior to sacrifice at 12-, 24- and 32-month of age. This chronic physical intervention was tested on motility in the Open field (OF). Cognitive functions were measured in the Morris water maze (MWM) for spatial learning and in the Novel object recognition (NOR) tests. Since learning and memory are closely associated with cholinergic forebrain function ChAT fiber density after exercise training was assessed in hippocampus, and motor- and somatosensory cortical areas. Furthermore, quantification of ChAT-positive fiber aberrations as a neuropathological marker was also carried out in these brain areas. Our results show that in OF chronic exercise maintained horizontal locomotor activity in all age groups. Rearing activity, MWM and notably NOR performance were improved only in the 32-months old animals. Regarding cholinergic neuronal innervation, apart from a general age-related decline, exercise increased ChAT fiber density in the hippocampus CA1 area and in the motor cortex notably in the 32-months group. Massive ChAT fiber aberrations in all investigated areas which developed in senescence were clearly attenuated by exercise. The results suggest that moderate intensity chronic exercise in the rat is especially beneficial in advanced age. In conclusion, chronic exercise attenuates the age-related decline in cognitive and motor behaviors as well as age-related cholinergic fiber reduction, reduces malformations of cholinergic forebrain innervation.

During advanced aging passive exercise (PE) is becoming a valuable therapeutic intervention to improve physical and mental performances. In the present study chronic low frequency pulsed electromagnetic field (EMF) exposure was presented to senescent rats in order to clarify the behavioural effects related to cognitive and motility functions. Male Wistar rats of 30-32 months old were treated with EMF for six weeks, 3 times per week, 24 min per sessions prior to the age of 32 months. Stimulation intensities varied from 45 to 1250 μ T. Psychomotility was estimated in an open field (OF), attention ability in novel object recognition (NOR), and spatial learning in the Morris water maze

(MWM) tests. The results showed that EMF stimulation enhanced novelty-induced motility of vertical type, i.e. frequency of rearing activity was increased. In the cognitive tests EMF exposure increased attention-based discrimination in NOR and facilitated working memory type of spatial learning in the MWM tests. No undesirable type of side effects could be obtained even after the highest dose used. It is concluded that EMF stimulation in senescent age supports cognitive and psychomotor function in rats. The notion that PE may have complementary beneficial action on brain and motor functions in senescent age is strengthened by the present experimental results.

10. Irodalomjegyzék

- Aarsland D, Sardahaee FS, Anderssen S, Ballard C, Alzheimer's Society Systematic Review group. (2010) Is physical activity a potential preventive factor for vascular dementia? A systematic review. *Aging Ment Health*, 14: 386–395.
- Abbott RD, White LR, Ross GW, Masaki KH, Curb JD, Petrovitch H. (2004) Walking and Dementia in Physically Capable Elderly Men. *JAMA*, 292: 1447.
- Abe K. (2012) Total daily physical activity and the risk of ad and cognitive decline in older adults. *Neurology*, 79: 1071.
- Adlard PA, Perreau VM, Cotman CW. (2005) The exercise-induced expression of BDNF within the hippocampus varies across life-span. *Neurobiol Aging*, 26: 511–520.
- Ahlskog JE. (2011) Does vigorous exercise have a neuroprotective effect in Parkinson disease? *Neurology*, 77: 288–294.
- Akbarnejad Z, Esmaeilpour K, Shabani M, Asadi-Shekaari M, Saeedi goraghani M, Ahmadi-Zeidabadi M. (2017) Spatial memory recovery in Alzheimer's rat model by electromagnetic field exposure. *Int J Neurosci*, 7454: 1–6.
- Albeck DS, Sano K, Prewitt GE, Dalton L. (2006) Mild forced treadmill exercise enhances spatial learning in the aged rat. *Behav Brain Res*, 168: 345–348.
- Alonso-Frech F, Sanahuja JJ, Rodriguez AM. (2011) Exercise and physical therapy in early management of Parkinson disease. *Neurologist*, 17: 47–53.
- Ando S, Kobayashi S, Waki H, Kon K, Fukui F, Tadenuma T, Iwamoto M, Takeda Y, Izumiyama N, Watanabe K, Nakamura H. (2002) Animal model of dementia induced by entorhinal synaptic damage and partial restoration of cognitive deficits by BDNF and carnitine. *J Neurosci Res*, 70: 519–527.

- Antonova E, Parslow D, Brammer M, Dawson GR, Jackson SHD, Morris RG. (2009) Age-related neural activity during allocentric spatial memory. *Memory*, 17: 125–143.
- Archer T. (2011) Physical exercise alleviates debilities of normal aging and Alzheimer's disease. *Acta Neurol Scand*, 123: 221–238.
- Arendash GW. (2016) Review of the Evidence that Transcranial Electromagnetic Treatment will be a Safe and Effective Therapeutic Against Alzheimer's Disease. *J Alzheimer's Dis*, 53: 753–771.
- Azimi M, Gharakhanlou R, Naghdi N, Khodadadi D, Heysieattalab S. (2018) Moderate treadmill exercise ameliorates amyloid- β -induced learning and memory impairment, possibly via increasing AMPK activity and up-regulation of the PGC-1 α /FNDC5/BDNF pathway. *Peptides*, 102: 78–88.
- Baehr LM, West DWD, Marshall AG, Marcotte GR, Baar K, Bodine SC. (2017) Muscle-specific and age-related changes in protein synthesis and protein degradation in response to hindlimb unloading in rats. *J Appl Physiol*, 122: 1336–1350.
- Baquer NZ, Taha A, Kumar P, McLean P, Cowsik SM, Kale RK, Singh R, Sharma D. (2009) A metabolic and functional overview of brain aging linked to neurological disorders. *Biogerontology*, 10: 377–413.
- Barker AT, Freeston IL, Jalinous R, Jarratt JA. (1987) Magnetic stimulation of the human brain and peripheral nervous system: an introduction and the results of an initial clinical evaluation. *Neurosurgery*, 20: 100–109.
- Barnard ND, Bush AI, Ceccarelli A, Cooper J, Jager CA De, Erickson KI, Fraser G, Kesler S, Levin SM, Lucey B, Clare M, Squitti R. (2014) Neurobiology of Aging Dietary and lifestyle guidelines for the prevention of Alzheimer ' s disease. *Neurobiol Aging*, 35: S74–S78.

- Barnes CA, Forster MJ, Fleshner M, Ahanotu EN, Laudenslager ML, Mazzeo RS, Maier SF, Lal H. (1991) Exercise does not modify spatial memory, brain autoimmunity, or antibody response in aged F-344 rats. *Neurobiol Aging*, 12: 47–53.
- Barth AMI, Mody I. (2014) Novel test of motor and other dysfunctions in mouse neurological disease models. *J Neurosci Methods*, 221: 151–158.
- Basser PJ, Roth BJ. (1991) Stimulation of a myelinated nerve axon by electromagnetic induction. *Med Biol Eng Comput*, 29: 261–268.
- Bassett CAL. (1993) Beneficial effects of electromagnetic fields. *J Cell Biochem*, 51: 387–393.
- Benedict C, Brooks SJ, Kullberg J, Nordenskjöld R, Burgos J, Le Grevès M, Kilander L, Larsson EM, Johansson L, Ahlström H, Lind L, Schiöth HB. (2013) Association between physical activity and brain health in older adults. *Neurobiol Aging*, 34: 83–90.
- Benichou R. (2011) Fusion of line operators in conformal sigma-models on supergroups, and the Hirota equation. *J High Energy Phys*, 2011: 408–414.
- Berchtold NC, Castello N, Cotman CW. (2010) Exercise and time-dependent benefits to learning and memory. *Neuroscience*, 167: 588–597.
- Bohnen NI, Albin RL. (2011) The cholinergic system and Parkinson disease. *Behav Brain Res*, 221: 564–573.
- Bohnen NI, Müller MLTM, Koeppe RA, Studenski SA, Kilbourn MA, Frey KA, Albin RL. (2009) History of falls in Parkinson disease is associated with reduced cholinergic activity. *Neurology*, 73: 1670–1676.
- Bonaconsa M, Colavito V, Pifferi F, Aujard F, Schenker E, Dix S, Grassi-Zucconi G, Bentivoglio M, Bertini G. (2013) Cell clocks and neuronal networks: neuron ticking and synchronization in aging and aging-related neurodegenerative disease. *Curr Alzheimer Res*, 10: 597–608.

- Bradford MM. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72: 248–254.
- Burke DM. Memory and aging. In: *Aspects of Memory: The practical aspects*, Gruneberg MM, Morris PE (szerk.), Taylor & Frances/Routledge, USA, 1992: 124–146.
- Buzsáki G. (2005) Theta rhythm of navigation: Link between path integration and landmark navigation, episodic and semantic memory. *Hippocampus*, 15: 827–840.
- Byers JM, Clark KF, Thompson GC. (1998) Effect of pulsed electromagnetic stimulation on facial nerve regeneration. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 124: 383–389.
- Cabeza R, Anderson ND, Locantore JK, McIntosh AR. (2002) Aging gracefully: Compensatory brain activity in high-performing older adults. *Neuroimage*, 17: 1394–1402.
- Cho J, Shin MK, Kim D, Lee I, Kim S, Kang H. (2015) Treadmill Running Reverses Cognitive Declines due to Alzheimer Disease. *Med Sci Sports Exerc*, 47: 1814–1824.
- Choi DH, Kwon IS, Koo JH, Jang YC, Kang EB, Byun JE, Um HS, Park HS, Yeom DC, Cho IH, Cho JY. (2014) The effect of treadmill exercise on inflammatory responses in rat model of streptozotocin-induced experimental dementia of Alzheimer's type. *J Exerc Nutr Biochem*, 18: 225–233.
- Coelho FG de M, Vital TM, Stein AM, Arantes FJ, Rueda AV, Camarini R, Teodorov E, Santos-Galduróz RF. (2014) Acute aerobic exercise increases brain-derived neurotrophic factor levels in elderly with Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, 39: 401–408.
- Cohen SJ, Munchow AH, Rios LM, Zhang G, Ásgeirsdóttir HN, Stackman RW. (2013) The rodent hippocampus is essential for nonspatial object memory. *Curr Biol*, 23: 1685–1690.

- Cohen SJ, Stackman RW. (2015) Assessing rodent hippocampal involvement in the novel object recognition task. A review. *Behav Brain Res*, 285: 105–117.
- Colcombe SJ, Erickson KI, Scalf PE, Kim JS, Prakash R, McAuley E, Elavsky S, Marquez DX, Hu L, Kramer AF. (2006) Aerobic exercise training increases brain volume in aging humans. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 61: 1166–1170.
- De Santi S, de Leon MJ, Convit A, Tarshish C, Rusinek H, Tsui WH, Sinaiko E, Wang GJ, Bartlet E, Volkow N. (1995) Age-related changes in brain: II. Positron emission tomography of frontal and temporal lobe glucose metabolism in normal subjects. *Psychiatr, Q* 66: 357–370.
- Defina LF, Willis BL, Radford NB, Gao A, Leonard D, Haskell WL, Weiner MF, Berry JD. (2014) *NIH Public Access.*, 158: 162–168.
- Dietrich MO, Andrews ZB, Horvath TL. (2008) Exercise-induced synaptogenesis in the hippocampus is dependent on UCP2-regulated mitochondrial adaptation. *J Neurosci*, 28: 10766–10771.
- Dringenberg HC. (2000a) Alzheimer's disease: More than a „cholinergic disorder” - Evidence that cholinergic-monoaminergic interactions contribute to EEG slowing and dementia. *Behav Brain Res*, 115: 235–249.
- Dringenberg HC. (2000b) Alzheimer's disease: More than a „cholinergic disorder” - Evidence that cholinergic-monoaminergic interactions contribute to EEG slowing and dementia. *Behav Brain Res*, 115: 235–249.
- Driscoll I, Hamilton DA, Petropoulos H, Yeo RA, Brooks WM, Baumgartner RN, Sutherland RJ. (2003) The Aging Hippocampus: Cognitive, Biochemical and Structural Findings. *Cereb Cortex*, 13: 1344–1351.
- Dura G, Csorba E, Guseo A (1988) Experimental Study of the Influence of Pulsating Electromagnetic Field on Motor Activity. *J Bioelectr*, 7: 133–135.

- Erickson KI, Voss MW, Prakash RS, Basak C, Szabo A, Chaddock L, Kim JS, Heo S, Alves H, White SM, Wojcicki TR, Mailey E, Vieira VJ, Martin SA, Pence BD, Woods JA, McAuley E, Kramer AF. (2011a) Exercise training increases size of hippocampus and improves memory. *Proc Natl Acad Sci*, 108: 3017–3022.
- Erickson KI, Voss MW, Prakash RS, Basak C, Szabo A, Chaddock L, Kim JS, Heo S, Alves H, White SM, Wojcicki TR, Mailey E, Vieira VJ, Martin SA, Pence BD, Woods JA, McAuley E, Kramer AF. (2011b) Exercise training increases size of hippocampus and improves memory. *Proc Natl Acad Sci*, 108: 3017–3022.
- Fabel K, Wolf SA, Ehninger D, Babu H, Leal-Galicia P, Kempermann G. (2009) Additive effects of physical exercise and environmental enrichment on adult hippocampal neurogenesis in mice. *Front Neurosci*, 3: 1–7.
- Fanselow MS, Dong H-W. (2010) Are the Dorsal and Ventral Hippocampus Functionally Distinct Structures? *Neuron*, 65: 7–19.
- Ferencz B, Laukka EJ, Welmer A, Kalpouzos G, Angleman S, Keller L, Graff C, Lövdén M, Bäckman L. (2014) The benefits of staying active in old age: Physical activity counteracts the negative influence of PICALM, BIN1, and CLU risk alleles on episodic memory functioning. *Psychol Aging*, 29: 440–449.
- Fordyce DE, Farrar RP. (1991) Enhancement of spatial learning in F344 rats by physical activity and related learning-associated alterations in hippocampal and cortical cholinergic functioning. *Behav Brain Res*, 46: 123–133.
- Forster MJ, Dubey A, Dawson KM, Stutts WA, Lal H, Sohal RS. (1996) Age-related losses of cognitive function and motor skills in mice are associated with oxidative protein damage in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93: 4765–4769.
- Foster TC. (2006) Biological markers of age-related memory deficits: treatment of senescent physiology. *CNS Drugs*, 20: 153–166.
- Funahashi S. (2017) Working Memory in the Prefrontal Cortex. *Brain Sci*, 7: 49.

- Gage FH, Dunnett SB, Bjorklund A. (1984) Spatial learning and motor deficits in aged rats. *Neurobiol Aging*, 5: 43–48.
- Gandy S. (2002) Molecular basis for anti-amyloid therapy in the prevention and treatment of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 23: 1009–1016.
- Gaykema RPA, Nyakas C, Horvath E, Hersh LB, Majtenyi C, Luiten PGM. (1992) Cholinergic fiber aberrations in nucleus basalis lesioned rat and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 13: 441–448.
- Gazzaley A, Clapp W, Kelley J, McEvoy K, Knight RT, D'Esposito M. (2008) Age-related top-down suppression deficit in the early stages of cortical visual memory processing. *Proc Natl Acad Sci*, 105: 13122–13126.
- Geda Y, Roberts R, Knopman D, Christianson T, Pankratz V, Ivnik R, Boeve B, Tangalos E, Petersen R, Rocca W. (2010) Physical exercise, aging, and mild cognitive impairment: a population-based study. *Arch Neurol*, 67: 80–86.
- Golbach LA, Scheer MH, Cuppen JJM, Savelkoul H, Verburg-Van Kemenade BML. (2015) Low-Frequency Electromagnetic Field Exposure Enhances Extracellular Trap Formation by Human Neutrophils through the NADPH Pathway. *J Innate Immun*, 7: 459–465.
- Grady CL, Craik FI. (2000) Changes in memory processing with age. *Curr Opin Neurobiol*, 10: 224–231.
- Hillman CH, Erickson KI, Kramer AF. (2008) Be smart, exercise your heart: exercise effects on brain and cognition. *Nat Rev Neurosci*, 9: 58–65.
- Horner AM, Russ DW, Biknevicius AR. (2011) Effects of early-stage aging on locomotor dynamics and hindlimb muscle force production in the rat. *J Exp Biol*, 214: 3588–3595.
- Hovens IB, van Leeuwen BL, Nyakas C, Heineman E, van der Zee EA, Schoemaker RG. (2015) Postoperative cognitive dysfunction and microglial activation in associated brain regions in old rats. *Neurobiol Learn Mem*, 118: 74–79.

- Hötting K, Röder B. (2013) Beneficial effects of physical exercise on neuroplasticity and cognition. *Neurosci Biobehav Rev*, 37: 2243–2257.
- Jadidi M, Firoozabadi SM, Rashidy-Pour A, Sajadi AA, Sadeghi H, Taherian AA. (2007) Acute exposure to a 50 Hz magnetic field impairs consolidation of spatial memory in rats. *Neurobiol Learn Mem*, 88: 387–392.
- Jin J-J, Ko I-G, Kim S-E, Hwang L, Lee M-G, Kim D-Y, Jung S-Y. (2017) Age-dependent differences of treadmill exercise on spatial learning ability between young- and adult-age rats. *J Exerc Rehabil*, 13: 381–386.
- Kamp D, Krause V, Butz M, Schnitzler A, Pollok B. (2013) Changes of cortico-muscular coherence: an early marker of healthy aging? *Age (Omaha)*, 35: 49–58.
- Karceski S. (2012) Preventing Alzheimer disease with exercise? *Neurology*, 78: e110–e112.
- Kása P, Rakonczay Z, Gulya K. (1997) The cholinergic system in Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol*, 52: 511–535.
- Komaki A, Khalili A, Salehi I, Shahidi S, Sarihi A. (2014) Effects of exposure to an extremely low frequency electromagnetic field on hippocampal long-term potentiation in rat. *Brain Res*, 1564: 1–8.
- Konishi K, Etchamendy N, Roy S, Marighetto A, Rajah N, Bohbot VD. (2013) Decreased functional magnetic resonance imaging activity in the hippocampus in favor of the caudate nucleus in older adults tested in a virtual navigation task. *Hippocampus*, 23: 1005–1014.
- Kotagal V, Albin RL, Müller MLTM, Koeppe RA, Chervin RD, Frey KA, Bohnen NI. (2012a) Symptoms of rapid eye movement sleep behavior disorder are associated with cholinergic denervation in Parkinson disease. *Ann Neurol*, 71: 560–568.
- Kotagal V, Müller MLTM, Kaufer DI, Koeppe RA, Bohnen NI. (2012b) Thalamic cholinergic innervation is spared in Alzheimer disease compared to parkinsonian disorders. *Neurosci Lett*, 514: 169–172.

- Krampe RT. (2002) Aging, expertise and fine motor movement. *Neurosci Biobehav Rev*, 26: 769–776.
- Laemmli UK. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680–685.
- Lai H, Carino MA, Horita A, Guy AW. (1993) Effects of a 60 Hz magnetic field on central cholinergic systems of the rat. *Bioelectromagnetics*, 14: 5–15.
- Lai J, Zhang Y, Liu X, Zhang J, Ruan G, Chaugai S, Chen C, Wang DW. (2016) Effects of extremely low frequency electromagnetic fields (100 μ T) on behaviors in rats. *Neurotoxicology*, 52: 104–113.
- Lange-Asschenfeldt C, Kojda G. (2008) Alzheimer's disease, cerebrovascular dysfunction and the benefits of exercise: From vessels to neurons. *Exp Gerontol*, 43: 499–504.
- Larson J, Lynch G, Games D, Seubert P. (1999) Alterations in synaptic transmission and long-term potentiation in hippocampal slices from young and aged PDAPP mice. *Brain Res*, 840: 23–35.
- Lee M, Soya H. (2017) Effects of acute voluntary loaded wheel running on BDNF expression in the rat hippocampus. *J Exerc Nutr Biochem*, 21: 52–57.
- Leem YH, Lee YI, Son HJ, Lee SH. (2011) Chronic exercise ameliorates the neuroinflammation in mice carrying NSE/htau23. *Biochem Biophys Res Commun*, 406: 359–365.
- Li KZH, Lindenberger U. (2002) Relations between aging sensory / sensorimotor and cognitive functions. *Neurosci Biobehav Rev*, 26: 777–783.
- Li W, Yang Y, Ye Q, Yang B, Wang Z. (2007) Effect of chronic and acute low-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation on spatial memory in rats. *Brain Res Bull*, 71: 493–500.

- Li Y, Yan X, Liu J, Li L, Hu X, Sun H, Tian J. (2014) Pulsed electromagnetic field enhances brain-derived neurotrophic factor expression through L-type voltage-gated calcium channel- and Erk-dependent signaling pathways in neonatal rat dorsal root ganglion neurons. *Neurochem Int*, 75: 96–104.
- Lin TW, Chen SJ, Huang TY, Chang CY, Chuang JI, Wu F Sen, Kuo YM, Jen CJ. (2012) Different types of exercise induce differential effects on neuronal adaptations and memory performance. *Neurobiol Learn Mem*, 97: 140–147.
- Lin TW, Shih YH, Chen SJ, Lien CH, Chang CY, Huang TY, Chen SH, Jen CJ, Kuo YM. (2015a) Running exercise delays neurodegeneration in amygdala and hippocampus of Alzheimer's disease (APP/PS1) transgenic mice. *Neurobiol Learn Mem*, 118: 189–197.
- Lin Y, Lu X, Dong J, He X, Yan T, Liang H, Sui M, Zheng X, Liu H, Zhao J, Lu X. (2015b) Involuntary, Forced and Voluntary Exercises Equally Attenuate Neurocognitive Deficits in Vascular Dementia by the BDNF–pCREB Mediated Pathway. *Neurochem Res*, 40: 1839–1848.
- Lippa AS, Pelham RW, Beer B, Critchett DJ, Dean RL, Bartus RT. (1980) Brain cholinergic dysfunction and memory in aged rats. *Neurobiol Aging*, 1: 13–19.
- Liu TT, Wang S, He LH, Ye KP. (2008) Chronic exposure to low-intensity magnetic field improves acquisition and maintenance of memory. *Neuroreport*, 19: 549–552.
- Liu X, Zuo H, Wang D, Peng R, Song T, Wang S, Xu X, Gao Y, Li Y, Wang S, Wang L, Zhao L. (2015) Improvement of spatial memory disorder and hippocampal damage by exposure to electromagnetic fields in an Alzheimer's disease rat model. *PLoS One*, 10: 1–14.
- Liu Y-F, Chen H, Wu C-L, Kuo Y-M, Yu L, Huang A-M, Wu F-S, Chuang J-I, Jen CJ. (2009) Differential effects of treadmill running and wheel running on spatial or aversive learning and memory: roles of amygdalar brain-derived neurotrophic factor and synaptotagmin I. *J Physiol*, 587: 3221–3231.

- Luck T, Riedel-Heller SG, Lupp M, Wiese B, Köhler M, Jessen F, Bickel H, Weyerer S, Pentzek M, König H-H, Prokein J, Ernst A, Wagner M, Mösch E, Werle J, Fuchs A, Brettschneider C, Scherer M, Maier W. (2014) Apolipoprotein E epsilon 4 genotype and a physically active lifestyle in late life: analysis of gene–environment interaction for the risk of dementia and Alzheimer’s disease dementia. *Psychol Med*, 44: 1319–1329.
- Luiten P, Nyakas C, Eisel U, van der Zee E. Aging of the Brain. In: *Neuroscience in the 21st Century*, Donald W Pfaff (szerk.), Springer, New York, 2013: 2239–2272.
- Luo F, Hou T, Zhang Z, Xie Z, Wu X, Xu J. (2012) Effects of Pulsed Electromagnetic Field Frequencies on the Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *Orthopedics*, 35: e526–e531.
- Madden DJ, Gottlob LR, Denny LL, Turkington TG, Provenzale JM, Hawk TC, Coleman RE. (1999) Aging and recognition memory: changes in regional cerebral blood flow associated with components of reaction time distributions. *J Cogn Neurosci*, 11: 511–520.
- Mani RB, Lohr JB, Jeste D V. (1986) Hippocampal pyramidal cells and aging in the human: a quantitative study of neuronal loss in sectors CA1 to CA4. *Exp Neurol*, 94: 29–40.
- Mattson MP, Maudsley S, Martin B. (2004) BDNF and 5-HT: a dynamic duo in age-related neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci*, 27: 589–594.
- McCaig CD, Rajnicek a M. (1991) Electrical fields, nerve growth and nerve regeneration. *Exp Physiol*, 76: 473–494.
- McQuail JA, Riddle DR, Nicolle MM. (2011) Neuroinflammation not associated with cholinergic degeneration in aged-impaired brain. *Neurobiol Aging*, 32: 2322.e1–e2322.e4.

- Meco A Di, Joshi YB, Praticò D. (2014) Neurobiology of Aging Sleep deprivation impairs memory , tau metabolism , and synaptic integrity of a mouse model of Alzheimer ' s disease with plaques and tangles. *Neurobiol Aging*, 35: 1813–1820.
- Melicherik AM, Elliott KS, Bianchi C, Ernst SM, Winters BD. (2012) Nicotinic receptor activation in perirhinal cortex and hippocampus enhances object memory in rats. *Neuropharmacology*, 62: 2096–2105.
- Miller SL, Celone K, DePeau K, Diamond E, Dickerson BC, Rentz D, Pihlajamäki M, Sperling R. (2008) Age-related memory impairment associated with loss of parietal deactivation but preserved hippocampal activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105: 2181–2186.
- Moffat SD, Elkins W, Resnick SM. (2006) Age differences in the neural systems supporting human allocentric spatial navigation. *Neurobiol Aging*, 27: 965–972.
- Moffat SD, Zonderman AB, Resnick SM. (2001) Age differences in spatial memory in a virtual environment navigation task. *Neurobiol Aging*, 22: 787–796.
- Mora F, Segovia G, del Arco A. (2007) Aging, plasticity and environmental enrichment: Structural changes and neurotransmitter dynamics in several areas of the brain. *Brain Res Rev*, 55: 78–88.
- Morris R. (1984a) Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods*, 11: 47–60.
- Morris R. (1984b) Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods*, 11: 47–60.
- Mostafa RM, Mostafa YM, Ennaceur A. (2002) Effects of exposure to extremely low-frequency magnetic field of 2 G intensity on memory and corticosterone level in rats. *Physiol Behav*, 76: 589–595.

- Muscari A, Giannoni C, Pierpaoli L, Berzigotti A, Maietta P, Foschi E, Ravaioli C, Poggiopollini G, Bianchi G, Magalotti D, Tentoni C, Zoli M. (2010) Chronic endurance exercise training prevents aging-related cognitive decline in healthy older adults: A randomized controlled trial. *Int J Geriatr Psychiatry*, 25: 1055–1064.
- Nairn JG, Bedi KS, Mayhew TM, Campbell LF. (1989) On the number of purkinje cells in the human cerebellum: Unbiased estimates obtained by using the “fractionator”. *J Comp Neurol*, 290: 527–532.
- Nichol KE, Poon WW, Parachikova AI, Cribbs DH, Glabe CG, Cotman CW. (2008) Exercise alters the immune profile in Tg2576 Alzheimer mice toward a response coincident with improved cognitive performance and decreased amyloid. *J Neuroinflammation*, 5: 13.
- Norton S, Matthews FE, Barnes DE, Yaffe K, Brayne C. (2014) Potential for primary prevention of Alzheimer’s disease: An analysis of population-based data. *Lancet Neurol*, 13: 788–794.
- Nyakas C, Felszeghy K, Szabó R, Keijser JN, Luiten PGM, Szombathelyi Z, Tihanyi K. (2009) Neuroprotective Effects of Vinpocetine and its Major Metabolite Cis -apovincaminic Acid on NMDA-Induced Neurotoxicity in a Rat Entorhinal Cortex Lesion Model. *CNS Neurosci Ther*, 15: 89–99.
- Nyakas C, Granic I, Halmy LG, Banerjee P, Luiten PGM. (2011) The basal forebrain cholinergic system in aging and dementia. Rescuing cholinergic neurons from neurotoxic amyloid- β 42 with memantine. *Behav Brain Res*, 221: 594–603.
- O’Callaghan RM, Ohle R, Kelly ÁM. (2007) The effects of forced exercise on hippocampal plasticity in the rat: A comparison of LTP, spatial- and non-spatial learning. *Behav Brain Res*, 176: 362–366.
- Ossenkopp K-P, Ossenkopp MD. (1983) Geophysical Variables and Behavior: XI. Open-Field Behaviors in Young Rats Exposed to an ELF Rotating Magnetic Field. *Psychol Rep*, 52: 343–349.

- Paillard T, Rolland Y, de Souto Barreto P. (2015) Protective Effects of Physical Exercise in Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease: A Narrative Review. *J Clin Neurol*, 11: 212–219.
- Pakkenberg B, Gundersen HJG. (1997) Neocortical Neuron Number in Humans: Effects of Sex and Age. *J Comp Neurol*, 384: 312–320.
- Paxinos G, Watson C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. In: Büttner J (szerk.), Academic Press, San Diego, 1997
- Pereira AC, Huddleston DE, Sosunov AA, Brickman AM, Hen R, McKhann GM, Sloan R, Gage FH, Brown TR, Small SA. (2007) An in vivo correlate of exercise-induced neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104: 5638–5643.
- Pérez CA, Cancela Carral JM. (2008) Benefits of Physical Exercise for Older Adults With Alzheimer's Disease. *Geriatr Nurs (Minneap)*, 29: 384–391.
- Perry EK. (1980) The cholinergic system in old age and AD. *Age Ageing*, 9: 7–10.
- Persinger MA, Ludwig HW, Ossenkopp KP. (1973) Psychophysiological effects of extremely low frequency electromagnetic fields: a review. *Percept Mot Skills*, 36: 1139–1151.
- Picciotto MR, Zoli M. (2002) Nicotinic receptors in aging and dementia. *J Neurobiol*, 53: 641–655.
- Pitkälä KH, Pöysti MM, Laakkonen ML, Tilvis RS, Savikko N, Kautiainen H, Strandberg TE. (2013) Effects of the Finnish Alzheimer Disease Exercise Trial (FINALEX): A randomized controlled trial. *JAMA Intern Med*, 173: 894–901.
- Platano D, Fattoretti P, Balialetti M, Bertoni-Freddari C, Aicardi G. (2008) Long-Term Visual Object Recognition Memory in Aged Rats. *Rejuvenation Res*, 11: 333–339.

- Ploughman M, Granter-Button S, Chernenko G, Attwood Z, Tucker BA, Mearow KM, Corbett D. (2007) Exercise intensity influences the temporal profile of growth factors involved in neuronal plasticity following focal ischemia. *Brain Res*, 1150: 207–216.
- Radak Z, Toldy A, Szabo Z, Siamilis S, Nyakas C, Silye G, Jakus J, Goto S. (2006) The effects of training and detraining on memory, neurotrophins and oxidative stress markers in rat brain. *Neurochem Int*, 49: 387–392.
- Rakic P. (1985) Limits of neurogenesis in primates. *Science*, 227: 1054–1056.
- Raz N, Ghisletta P, Rodrigue KM, Kennedy KM, Lindenberger U. (2010) Trajectories of brain aging in middle-aged and older adults: Regional and individual differences. *Neuroimage*, 51: 501–511.
- Reuter-Lorenz P a, Jonides J, Smith EE, Hartley A, Miller A, Marshuetz C, Koeppel R. (2000) Age differences in the frontal lateralization of verbal and spatial working memory revealed by PET. *J Cogn Neurosci*, 12: 174–187.
- Rolland Y, Pillard F, Klapouszczak A, Reynish E, Thomas D, Andrieu S, Rivière D, Vellas B. (2007) Exercise program for nursing home residents with Alzheimer’s disease: A 1-year randomized, controlled trial. *J Am Geriatr Soc*, 55: 158–165.
- Rossini PM, Rossi S, Babiloni C, Polich J. (2007) Clinical neurophysiology of aging brain: From normal aging to neurodegeneration. *Prog Neurobiol*, 83: 375–400.
- Rudolph K, Kr  uchi K, Wirz-Justice A, Feer H. (1985) Weak 50-Hz electromagnetic fields activate rat open field behavior. *Physiol Behav*, 35: 505–508.
- Rypma B, D’Esposito M. (2000) Isolating the neural mechanisms of age-related changes in human working memory. *Nat Neurosci*, 3: 509–515.
- Sakhaie MH, Soleimani M, Pourheydar B, Majd Z, Atefimanesh P, Asl SS, Mehdizadeh M. (2017) Effects of Extremely Low-Frequency Electromagnetic Fields on Neurogenesis and Cognitive Behavior in an Experimental Model of Hippocampal Injury. *Behav Neurol*, 2017: 1–9.

- Sandyk R. (1994) Alzheimer's disease: improvement of visual memory and visuocognitive performance by treatment with picotesla range magnetic fields. *Int J Neurosci*, 76: 185–225.
- Sandyk R. (1997) Immediate recovery of cognitive functions and resolution of fatigue by treatment with weak electromagnetic fields in a patient with multiple sclerosis. *Int J Neurosci*, 90: 59–74.
- Sandyk R. (1999) Yawning and stretching induced by transcranial application of AC pulsed electromagnetic fields in Parkinson's disease. *Int J Neurosci*, 97: 139–145.
- Seidler RD, Bernard JA, Burutolu TB, Fling BW, Gordon MT, Gwin JT, Kwak Y, Lipps DB. (2010) Motor control and aging: Links to age-related brain structural, functional, and biochemical effects. *Neurosci Biobehav Rev*, 34: 721–733.
- Selkoe DJ. (1982) Molecular pathology of the aging human brain. *Trends Neurosci*, 5: 332–336.
- Selkoe DJ. (2001) Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev*, 81: 741–766.
- Sert C, Deniz M, Düz MZ, Akşen F, Kaya A. (2002) The preventive effect on bone loss of 50-Hz, 1-mT electromagnetic field in ovariectomized rats. *J Bone Miner Metab*, 20: 345–349.
- Shevchenko VY, Krivovichev S V. Where Are Genes in Paulingite? Mathematical Principles of Formation of Inorganic Materials on the Atomic Level. In: *Science of Crystal Structures*, Springer International Publishing, New York, 2015: 291–297
- Šimić G, Kostović I, Winblad B, Bogdanović N. (1997) Volume and number of neurons of the human hippocampal formation in normal aging and Alzheimer's disease. *J Comp Neuro*, 379: 482–494.
- Stern Y, Habeck C, Moeller J, Scarmeas N, Anderson KE, Hilton HJ, Flynn J, Sackeim H, Van Heertum R. (2005) Brain networks associated with cognitive reserve in healthy young and old adults. *Cereb Cortex*, 15: 394–402.

- Stranahan AM, Khalil D, Gould E. (2007) Running induces widespread structural alterations in the hippocampus and entorhinal cortex. *Hippocampus*, 17: 1017–1022.
- Sutoo D, Akiyama K. (2003) Regulation of brain function by exercise. *Neurobiol Dis*, 13: 1–14.
- Tang Y, Nyengaard JR, Pakkenberg B, Gundersen HJG. (1997) Age-induced white matter changes in the human brain: A stereological investigation. *Neurobiol Aging*, 18: 609–615.
- Tanigawa T, Takechi H, Arai H, Yamada M, Nishiguchi S, Aoyama T. (2014) Effect of physical activity on memory function in older adults with mild Alzheimer’s disease and mild cognitive impairment. *Geriatr Gerontol Int*, 14: 758–762.
- Téglás T, Dörnyei G, Bretz K, Nyakas C. (2018) Whole-body pulsed EMF stimulation improves cognitive and psychomotor activity in senescent rats. *Behav Brain Res*, 349: 163–168.
- Téglás T, Németh Z, Koller Á, Van der Zee EA, Luiten PGM, Nyakas C. (2019) Effects of Long-Term Moderate Intensity Exercise on Cognitive Behaviors and Cholinergic Forebrain in the Aging Rat. *Neuroscience*, 411: 65-75.
- Teri L, Gibbons LE, McCurry SM, Logsdon RG, Buchner DM, Barlow WE, Lacroix AZ, McCormick W, Larson EB. (2013) Exercise Plus Behavioral Management. *J Am Med Assoc*, 290: 2015–2022.
- Tomás Pereira I, Burwell RD. (2015) Using the spatial learning index to evaluate performance on the water maze. *Behav Neurosci*, 129: 533–539.
- Troost E, Menkel S, Enghardt W, Hytry J, Kunath D, Makocki S, Hoffmann A, Jölck R. (2017) EP-1710: Chemical stability of BioXmark® following normofractionated and single-fraction proton beam therapy. *Radiother Oncol*, 123: S937–S938.

- Tsai SF, Ku NW, Wang TF, Yang YH, Shih YH, Wu SY, Lee CW, Yu M, Yang TT, Kuo YM. (2018) Long-term moderate exercise rescues age-related decline in hippocampal neuronal complexity and memory. *Gerontology*, 64: 1–11.
- Tseyslyer Y V., Shelyuk O V., Martynyuk VS, Nuryschenko NE. (2012) Effect of electromagnetic field of extremely low frequency on ATPase activity of actomyosin. *Ukr Biokhimichnyi Zhurnal*, 84: 62–67.
- Van der Borght K, Havekes R, Bos T, Eggen BJL, Van der Zee EA. (2007) Exercise improves memory acquisition and retrieval in the Y-maze Task: relationship with hippocampal neurogenesis. *Behav Neurosci*, 121: 324–334.
- Van der Staay FJ. (2006) Two months makes a difference in spatial orientation learning in very old FBNF1 rats. *Physiol Behav*, 87: 659–665.
- Van der Zee CE, Schuurman T, van der Hoop RG, Traber J, Gispen WH. (1990) Beneficial effect of nimodipine on peripheral nerve function in aged rats. *Neurobiol Aging*, 11: 451–456.
- van Dinteren R, Arns M, Jongsma MLA, Kessels RPC. (2014) P300 development across the lifespan: a systematic review and meta-analysis. *Di Russo F, szerk. PLoS One*, 9: e87347.
- van Praag H. (2005) Exercise Enhances Learning and Hippocampal Neurogenesis in Aged Mice. *J Neurosci*, 25: 8680–8685.
- van Praag H. (2009a) Exercise and the brain: something to chew on. *Trends Neurosci*, 32: 283–290.
- van Praag H, Kempermann G, Gage FH. (1999) Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci*, 2: 266–270.
- Varró P, Szemerszky R, Bárdos G, Világi I. (2009) Changes in synaptic efficacy and seizure susceptibility in rat brain slices following extremely low-frequency electromagnetic field exposure. *Bioelectromagnetics*, 30: 631–640.

- Vázquez-García M, Elías-Viñas D, Reyes-Guerrero G, Domínguez-González A, Verdugo-Díaz L, Guevara-Guzmán R. (2004) Exposure to extremely low-frequency electromagnetic fields improves social recognition in male rats. *Physiol Behav*, 82: 685–690.
- Vieira-Brock PL, McFadden LM, Nielsen SM, Smith MD, Hanson GR, Fleckenstein AE. (2015) Nicotine administration attenuates methamphetamine-induced novel object recognition deficits. *Int J Neuropsychopharmacol*, 18: 1–12.
- Vizi SE. Humán farmakológia. In: Vizi SE (szerk.), *Medicina Könyvkiadó Zrt*, Budapest, 1997: 160.
- Voelcker-Rehage C, Niemann C. (2013) Structural and functional brain changes related to different types of physical activity across the life span. *Neurosci Biobehav Rev*, 37: 2268–2295.
- Walsh RN, Cummins RA. (1976) The Open-Field Test: a critical review. *Psychol Bull*, 83: 482–504.
- World Health O. (2015) *World Report on Ageing and Health*.
- Wu SY, Wang TF, Yu L, Jen CJ, Chuang JI, Wu F Sen, Wu CW, Kuo YM. (2011) Running exercise protects the substantia nigra dopaminergic neurons against inflammation-induced degeneration via the activation of BDNF signaling pathway. *Brain Behav Immun*, 25: 135–146.
- Xiong JY, Li SC, Sun YX, Zhang XS, Dong ZZ, Zhong P, Sun XR. (2015) Long-term treadmill exercise improves spatial memory of male APP^{swe}/PS1^{dE9} mice by regulation of BDNF expression and microglia activation. *Biol Sport*, 32: 295–300.
- Xu JZ, Wang C, Hu Y, Croitoru A, Tao V. (2005) A web-based risk assessment system and service for child safety: The case of mid-town Toronto. *Geomatica*, 59: 149–158.

Zhang Y, Liu X, Zhang J, Li N. (2015) Short-term effects of extremely low frequency electromagnetic fields exposure on Alzheimer's disease in rats. *Int J Radiat Biol*, 91: 28–34.

Zienowicz RJ, Thomas BA, Kurtz WH, Orgel MG. (1991) A multivariate approach to the treatment of peripheral nerve transection injury: the role of electromagnetic field therapy. *Plast Reconstr Surg*, 87: 122—129.

Zigmond MJ, Cameron JL, Hoffer BJ, Smeyne RJ. (2012) Neurorestoration by physical exercise: Moving forward. *Parkinsonism Relat Disord*, 18: S147–S150.

<https://www.alz.org/>

11. Saját publikációk jegyzéke

11.1 Disszertációhoz kapcsolódó közlemények

- Téglás T, Dörnyei, G, Bretz K, Nyakas C. (2018) Whole-body pulsed EMF stimulation improves cognitive and psychomotor activity in senescent rats. Behav Brain Res, 349: 163–168. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2018.04.036> **IF: 3,173**
- Téglás T, Németh Z, Koller Á, Van der Zee EA, Luiten PGM, Nyakas Cs. (2019) Effects of long-term moderate intensity exercise on cognitive behaviors and cholinergic forebrain in the aging rat. Neuroscience, 411: 65-75. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.05.37> **IF: 3,382**

11.2 Független közlemények

- Berekméri E, Deák O, Téglás T, Sággy É, Horváth T, Aller M, Fekete Á, Köles L, Zelles T. (2019) Targeted single-cell electroporation loading of Ca²⁺ indicators in the mature hemicochlea preparation. Hear Res, 371: 75–86. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2018.11.004> **IF: 2,824**

12. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Prof. Dr. Nyakas Csabának, aki az ösztöndíjas éveim alatt mindvégig hasznos elméleti és gyakorlati tudás átadásával segítette a munkámat és bővítette a szakmai ismereteimet.

Továbbá szeretném megköszönni Prof. Dr. Radák Zsoltnak, hogy a Molekuláris Edzésélettani Kutató Központban biztosította számomra a Ph.D. kutatómunkámhoz szükséges feltételeket.